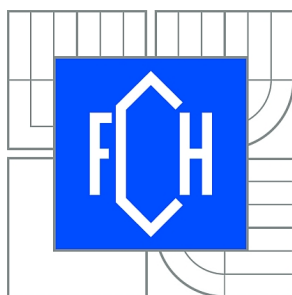




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VLIV PODMÍNEK PŘÍPRAVY NA SOLUBILIZAČNÍ VLASTNOSTI A STABILITU KOMPLEXŮ BIOPOLYMER-TENZID

INFLUENCE OF THE PREPARING OF A BIOPOLYMER-SURFACTANT COMPLEX ON ITS
STABILITY AND SOLUBILIZATION PROPERTIES.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. TEREZA KRUTIŠOVÁ

VEDOUcí PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. FILIP MRAVEC, Ph.D.

BRNO 2012



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0619/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Tereza Krutišová	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí práce	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Vliv podmínek přípravy na solubilizační vlastnosti a stabilitu komplexů biopolymer-tenzid

Zadání diplomové práce:

1. Shromáždit literární poznatky o způsobech stanovení stability a solubilizačních vlastností v koloidních systémech.
2. Seznámit se s jednotlivými technikami, využitelných pro toto studium s přihlédnutím k využití fluorescenčních technik.
3. Navrhnout a provést základní experimenty k porovnání stability a solubilizačních vlastností při různých způsobů přípravy vodných roztoků biopolymer-tenzid.
4. Zhodnotit výsledky ve vztahu k formulaci nosičových systémů biologicky aktivních látek na bázi komplexu biopolymer-tenzid.

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2012

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Tereza Krutišová
Student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 16.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Pomocí metody fluorescenční spektroskopie a dynamického rozptylu světla byl studován vliv podmínek přípravy systému biopolymer-tenzid na solubilizační vlastnosti a stabilitu vznikajících komplexů. Bylo provedeno zkoumání komplexů nativního hyaluronanu s kationtovým tenzidem cetyltrimetylamonium bromidem (CTAB), ve fyziologickém roztoku (NaCl o koncentraci $0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a ve vodě. Byl zkoumán vliv teploty zásobních roztoků při přípravě a vliv zmražení systému na jeho následné vlastnosti. Dále bylo zkoumáno, jaký vliv má způsob zavedení fluorescenční sondy do systému na jeho následné solubilizační vlastnosti. Bylo zjištěno, že podmínky přípravy systému biopolymer-tenzid mají významný vliv na solubilizační vlastnosti a stabilitu vznikajících komplexů.

ABSTRAKT

Influence of the preparing of a biopolymer-surfactant system on its solubilization properties and stability was investigated by using fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering methods. Investigation was made on complex of native hyaluronan with cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). System has been studied in aqueous and in saline solutions. The effect of temperature of stock solutions and freezing effect on subsequent properties were investigated. Further was examined, what effect has a way of introducing fluorescent probe into the system on subsequent solubilization properties. It was found that the conditions of preparing of biopolymer-surfactant system have a significant effect on the solubilization properties and stability of complex.

KLÍČOVÁ SLOVA

Hyaluronan, tenzid, fluorescenční spektroskopie, pyren, dynamický rozptyl světla

KEYWORDS

Hyaluronan, surfactant, fluorescence spectroscopy, pyren, dynamic light scattering

KRUTIŠOVÁ, T. *Vliv podmínek přípravy na solubilizační vlastnosti a stabilitu komplexů biopolymer-tenzid*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012, 67 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych srdečně poděkovala Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. a Ing. Tereze Halasové za odborný dohled, cenné rady a připomínky v průběhu celé práce. Dále bych chtěla poděkovat Centru materiálového výzkumu na FCH VUT v Brně, projektu OP VaVpI CZ.1.05/2.1.00/01.0012, za jehož podpory tato diplomová práce vznikla. V neposlední řadě také děkuji své rodině a příteli za podporu při studiu.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Kyselina hyaluronová	8
2.1.1	Struktura	8
2.1.2	Polymerní struktura a struktura v roztoku	9
2.1.3	Sekundární struktura	10
2.1.4	Metabolismus	10
2.1.5	Možnosti využití kyseliny hyaluronové	11
2.1.6	Role kyseliny hyaluronové při kancerogenních procesech	11
2.1.7	Cílená distribuce léčiv	12
2.2	Koloidní disperzní systémy	13
2.3	Asociativní micelární koloidy	14
2.3.1	Struktura micelárních koloidů	14
2.3.2	Micely a kritická micelární koncentrace	15
2.4	Optické vlastnosti koloidních soustav	16
2.4.1	Dynamický rozptyl světla	17
2.4.2	Princip DLS	17
2.4.3	Měření velikosti částic	18
2.5	Elektrické vlastnosti koloidních soustav	19
2.5.1	Měření potenciálu zeta	20
2.6	Fluorescence	22
2.6.1	Princip fluorescence, doba života a kvantový výtěžek fluorescence	22
2.6.2	Emisní a excitační spektrum fluorescence	23
2.6.3	Zákony a pravidla pro fluorescenci	24
2.6.4	Zhášení	24
2.6.5	Tvorba excimeru	25
2.6.6	Fluorescenční sonda – pyren	25
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	27
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
4.1	Materiály	29
4.2	Přehled experimentů	30
4.3	Příprava systémů	30
4.3.1	Zahřáté roztoky dávkovány do vialek s pyrenem	30
4.3.2	Pyren předsolubilizován v roztoku CTAB	31
4.3.3	Zmražení systémů	31
4.4	Měření a vyhodnocení dat	31
4.4.1	Fluorimetrie	31

4.4.2	Dynamický rozptyl světla.....	31
4.4.3	Statistika	33
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	34
5.1	Fluorimetrie	34
5.1.1	Zahřáté roztoky dávkovány do vialek s pyrenem.....	34
5.1.2	Pyren předsolubilizován v zásobním roztoku CTAB.....	40
5.2	Dynamický rozptyl světla.....	45
5.2.1	Režim SIZE, hyaluronan ($M_w = 73$ kDa) + CTAB v prostředí vody	45
5.2.2	Režim SIZE, hyaluronan ($M_w = 1,46$ MDa) + CTAB v prostředí vody	47
5.2.3	Režim ZETA, hyaluronan ($M_w = 73$ kDa) + CTAB v prostředí vody	50
5.2.4	Režim ZETA, hyaluronan ($M_w = 1,46$ MDa) + CTAB v prostředí vody ..	53
5.2.5	Systém hyaluronan + CTAB v prostředí soli	55
6	ZÁVĚR.....	56
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	58
8	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	63
8.1	Seznam zkratk	63
8.2	Seznam symbolů	63
9	PŘÍLOHY	64
9.1	Příloha 1	64

1 ÚVOD

Od doby, kdy byla kyselina hyaluronová považována jen za nezajímavou bílou substanci, uplynula již řada let. V dnešní době je již prokázáno mnoho možností jejího využití. V povědomí laické veřejnosti ovšem kyselina hyaluronová vystupuje stále pouze jako látka obsažená v kosmetických produktech proti vráskám a jako hydratační složka v nosních sprejích.

Málokdo ovšem ví, že je tato jedinečná látka přítomna ve všech savčích organismech a v závislosti na molekulové hmotnosti v nich zastává řadu funkcí. Vysokomolekulární kyselina hyaluronová je především přirozeným mazadlem všech kloubů a organizátorem pojivových i podpurných tkání. Kyselina s nízkou molekulovou hmotností ovlivňuje mobilitu buněk, a to jak těch zdravých, tak bohužel i rakovinných.

Studium nádorových buněk ukazuje, že tyto buňky obsahují poměrně značnou koncentraci kyseliny hyaluronové, díky níž mohou růst a tvořit metastázy. Kyselina hyaluronová má na druhou stranu také schopnost rakovinné buňky ničit díky unikátní schopnosti dopravit se na místo postižené nádorem. Na nádorových buňkách jsou specifická čidla, receptory CD44 a RHAMM, které rozpoznají kyselinu hyaluronovou a vtáhnou ji dovnitř. Pokud by se tedy podařilo vytvořit takovou částici, která ponese cytostatickou látku a bude obalena kyselinou hyaluronovou, dostal by se lék přímo na postižené místo. Díky této technologii by se léčba rakoviny stala pro lidský organismus mnohem šetrnější v porovnání s dnes používanou radioterapií a chemoterapií.

Na nosičovém systému tohoto typu se pracuje již několik let. Jednu z mnoha slibných variant, jak by mohl nosičový systém vypadat a fungovat, představuje systém vznikající interakcemi tenzidu a polymeru [1, 2]. Ideálním polymerem by pro svoje výjimečné vlastnosti mohla být právě kyselina hyaluronová.

Následující práce je zaměřena na vliv podmínek přípravy právě takových systémů. Velikost, tvar a stabilita těchto systémů může být ovlivněna již při přípravě systému. Tato práce je zaměřena hlavně na vliv teploty při přípravě a na vliv zmrazení systému na jeho následnou stabilitu a solubilizační vlastnosti, což jsou velmi důležité parametry pro následnou výrobní praxi.

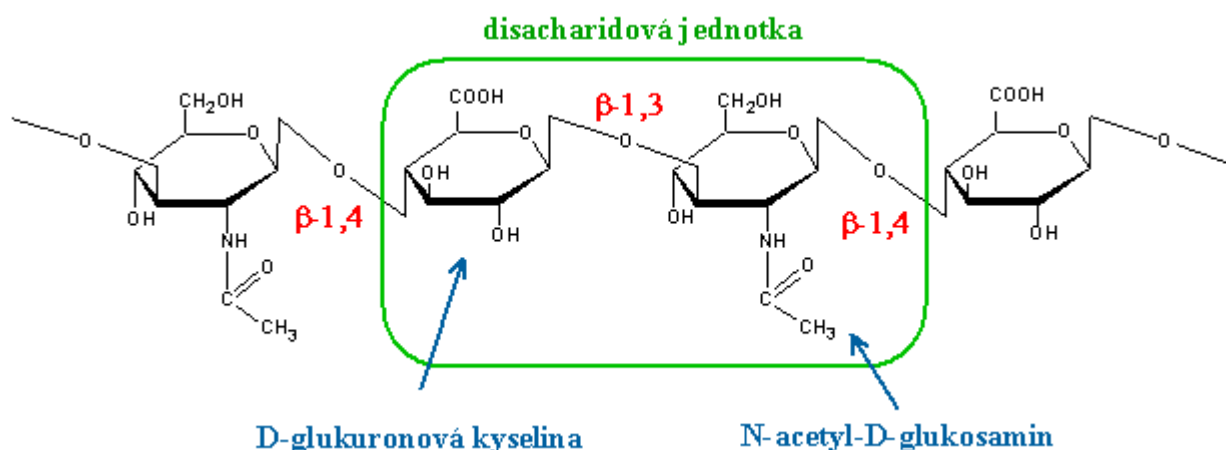
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kyselina hyaluronová

2.1.1 Struktura

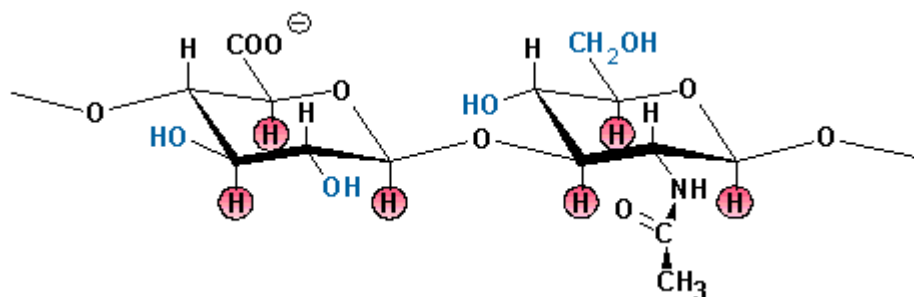
Kyselina hyaluronová byla objevena a popsána v roce 1934 v laboratoři Dr. Karla Meyera. Tehdy neznámý glykosaminoglykan byl izolován z očního sklivce skotu a následně byl nazván kyselinou hyaluronovou, čímž byla označena jedna z nejuniverzálnějších makromolekul v přírodě. Dnes je kyselina hyaluronová označována nejčastěji jako hyaluronan, protože v organismu existuje ve formě polyanionu a ne jako protonovaná kyselina.

Molekula hyaluronanu (Obr. 1) má nerozvětvenou lineární strukturu tvořenou opakujícími se disacharidovými podjednotkami. Tyto jednotky obsahují D-glukuronovou kyselinu a N-acetyl-D-glukosamin, které jsou spojeny pomocí střídajících se β -1,4 a β -1,3 glykosidických vazeb.



Obr. 1: Základní chemická struktura hyaluronanu

Oba cukry jsou prostorově spojeny glukózou, která v beta konfiguraci dovoluje prostorově objemným skupinám zaujmout stericky výhodnější ekvatoriální polohu, zatímco malé vodíkové atomy obsazují méně výhodné axiální polohy. Toto je hlavní důvod, proč je struktura molekuly energeticky velmi stabilní (Obr. 2) [3, 4]. Navzdory jednoduché primární struktuře vykazuje kyselina hyaluronová velmi rozdílné biologické účinky v závislosti na velikosti molekuly a jejím prostorovém uspořádání.

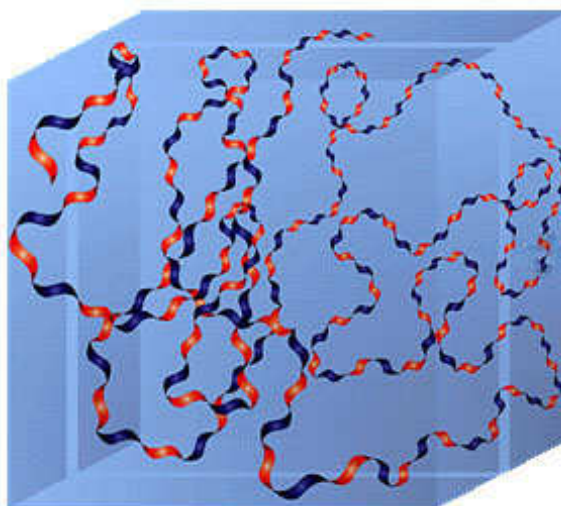


Obr. 2: Struktura hyaluronanu – vyobrazení prostorového uspořádání funkčních skupin

2.1.2 Polymerní struktura a struktura v roztoku

Enzymaticky syntetizovaný polymerní disacharid hyaluronan může být složen až z 25 000 disacharidových jednotek. Molekulová hmotnost takové molekuly polymeru se pohybuje v rozsahu od 5 000 Da do 20 000 Da. Průměrná molekulová hmotnost hyaluronanu nacházejícím se v lidské synoviální tekutině se pohybuje okolo tří až čtyř milionů Da.

Ve fyziologickém roztoku je molekula hyaluronanu vyztužena kombinací chemické struktury disacharidu, vnitřních vodíkových vazeb a interakcemi s rozpouštědlem. Axiální atomy vodíku formují nepolární, relativně hydrofobní domény, zatímco ekvatoriální postranní řetězce tvoří více polární, hydrofilní domény, čímž se vytváří zkroucená „stuhovitá“ struktura (Obr. 3). Následkem toho molekula hyaluronanu zaujímá ve fyziologickém roztoku roztaženou nepravidelně stočenou strukturu, která zabírá velmi širokou doménu. Domény jednotlivých molekul by se v roztoku navzájem překrývaly při koncentraci hyaluronanu $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a vyšší [3].



Obr. 3: Struktura hyaluronanu v roztoku (sv. modrá krychle vyobrazuje doménu molekuly v roztoku, modré a červené oblasti znázorňují hydrofilní, resp. hydrofobní části stuhovité struktury) [3]

Doménová struktura hyaluronanu má zajímavé a důležité důsledky. Malé molekuly, jako je voda, elektrolyty a živiny se mohou volně šířit rozpouštědlem uvnitř domény. Velké molekuly, jako bílkoviny, jsou částečně vylučovány z domény kvůli jejich hydrodynamické velikosti. Hyaluronanové sítě v doméně poskytují méně prostoru pro jiné molekuly, které jsou větší. To vede k pomalejší difúzi makromolekul skrz síť a jejich nižším koncentracím v síti ve srovnání s volnými prostory v okolí hyaluronanu.

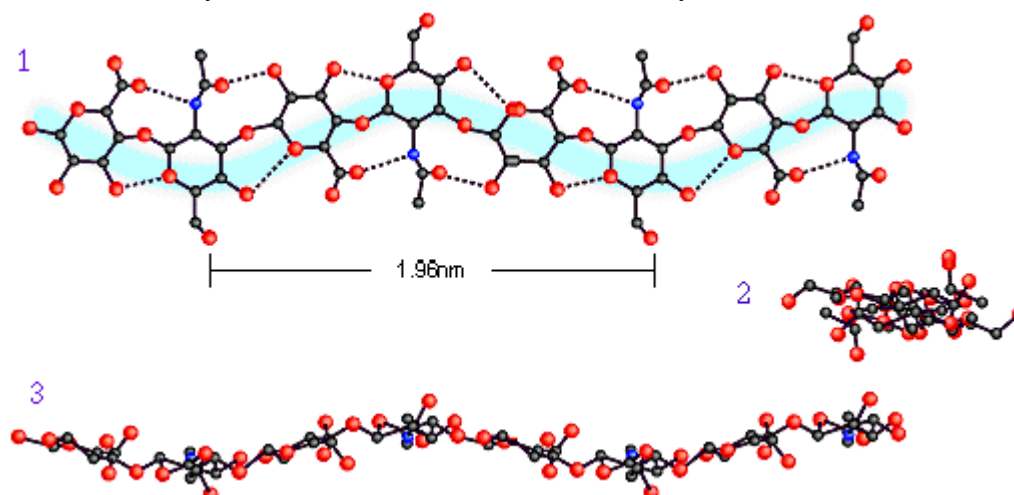
Hyaluronanové řetězce se v roztoku neustále pohybují, což způsobuje neustálou změnu velikosti efektivních pórů v síti. Statisticky mohou existovat všechny velikosti pórů, jen s různou pravděpodobností, což znamená, že všechny molekuly mohou projít hyaluronanovou sítí, ale s různým stupněm zpomalení v závislosti na jejich hydrodynamických objemech [3].

2.1.3 Sekundární struktura

Řetězce hyaluronanu obsahují dva typy vazeb – vazby v sacharidových jednotkách a vazby mezi jednotkami. Sacharidové jednotky si udržují relativně stálý tvar. Mezi těmito rigidními jednotkami existují glykosidické vazby, které sestávají z atomu kyslíku spojujícího jednotlivé sacharidy. Tyto atomy kyslíku jsou dvojnásobné a jejich vazby jsou orientovány jako ramena písmene „V“. Substituenty připojené na koncích ramen se mohou otáčet o 360 stupňů. Ačkoli není možná úplná svoboda ve vytváření konfigurací substituentů okolo atomu kyslíku, přesto každý glykosidický můstek poskytuje několik možných konfigurací. Vynásobením těchto možností počtem můstků v dlouhém řetězci získáme obrovské množství tvarů jedné molekuly. Uspořádání molekuly vypadá jako náhodné, ale není tomu tak.

Struktura má tvar dvojnásobné spirály (ne dvoušroubovice, do níž jsou zapojeny dva molekulární řetězce), ve které hraje důležitou roli voda jako stabilizační faktor. Tato jakoby pásková struktura vykazuje mírná zakřivení jak v průmětu, tak v prostorové projekci (Obr. 4).

Význam této sekundární struktury spočívá v existenci hydrofobní oblasti ve dvojité spirále o velikosti osmi uhlíkových atomů. Hyaluronan má tudíž vlastnosti vysoce hydrofilního materiálu současně s hydrofobními doménami. Jedná se tedy o amfifilní molekulu [4].



Obr. 4: Struktura hyaluronanu v roztoku; 1 – průmět, 2 – pohled podél osy dvojnásobné spirály, 3 – prostorová projekce [4]

2.1.4 Metabolismus

Metabolismus hyaluronanu je velmi dynamický. Některé buňky, jako například chondrocyty v chrupavkách, aktivně syntetizují a katabolizují hyaluronan po celou dobu života tkáně. Syntéza je většinou vyvážena s rozkladem, čímž se udržuje konstantní koncentrace hyaluronanu v tkáni. Poločas rozkladu molekuly hyaluronanu v chrupavce je obvykle dva až tři týdny. Poločas rozpadu hyaluronanu v krvi je překvapivě krátký, jen několik minut. V některých případech však převládá syntéza nebo rozklad hyaluronanu. Příkladem mohou být keratinocyty, ve kterých převažuje syntéza. Odhaduje se, že téměř jedna třetina z celkového množství hyaluronanu v lidském těle je metabolicky odstraněna a nahrazena během průměrného dne [3].

2.1.5 Možnosti využití kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová je mnohdy považována pouze za molekulu extracelulární matrix. Minulý a současný výzkum však objevuje nové a nové funkce této molekuly jak na buněčné, tak na orgánové úrovni.

Všechny získané znalosti o této molekule poukazují na to, že kyselina hyaluronová je molekula velkého významu. Je nutná pro správnou funkci organismu. Její všudypřítomnost a účast na celé řadě biologických procesů, jako jsou angiogeneze, migrace a proliferace různých buněčných typů, účast na zánětlivých procesech, procesech hojení ran a dalších, ukazuje na celou řadu možností využití této molekuly jako léčivé látky.

Díky svým unikátním vlastnostem našla kyselina hyaluronová již řadu uplatnění v nejrůznějších medicínských odvětvích. V revmatologii, oftalmologii, diabetologii, farmaceutické technologii a dalších oblastech, například při hojení ran [5].

Hyaluronan spolu s ostatními glykosaminoglykany a kolagenem tvoří důležitou složku mechanismu znovuoobnovení poraněné tkáně. Během prvních dnů po vzniku zranění je hyaluronan převládajícím glykosaminoglykanem v ráně. Při léčbě například kožních či očních poranění působí výrazně příznivě. U kožních popálenin a ran dochází k urychlení epitelizace a projevuje se schopnost hojení bez jizev. Také při terapii očních onemocnění je pozorováno rychlejší hojení poškozené rohovky [6].

Díky své vysoké biokompatibilitě a přítomnosti v extracelulární matrix tkáně získává hyaluronan popularitu jako vhodný materiál pro tkáňové inženýrství. Kvůli vysoké rozpustnosti nativního hyaluronanu ve vodě a jeho krátkému biologickému poločasu rozpadu je pro tyto aplikace častěji využíván zesítený modifikovaný hyaluronan ve formě hydrogelu [7].

Hyaluronan byl použit k syntéze biologických scaffoldů pro aplikaci při hojení ran. Tyto scaffoldy obvykle obsahují proteiny jako je fibronectin, které jsou navázány na hyaluronan, pro usnadnění migrace buněk do tkáně. Toho se využívá zejména u osob trpících na chronické diabetické rány [8].

Hyaluronan se používá také k léčbě osteoartrózy kolenního kloubu. Je aplikována série injekcí do kloubu, čímž dochází ke zvýšení viskozity kloubní tekutiny. To má za následek promazání a odpružení kloubu a analgetický účinek. Bylo také dokázáno, že hyaluronan má pozitivní biochemický efekt na chrupavku [9, 10].

Hyaluronan je dnes také široce používán jako aktivní látka v řadě kosmetických přípravků. Plet'ové mléko s hlavní účinnou složkou hyaluronanem sodným je používáno k léčbě atopického ekzému [11].

2.1.6 Role kyseliny hyaluronové při kancerogenních procesech

Kyselina hyaluronová má velký vliv při kancerogenním procesu. Interakcí se specifickým CD44 receptorem indukuje hyaluronan buněčnou motilitu, invazi rakovinných buněk a indukuje angiogenezi. Dnes je známo nejméně 14 typů karcinomů, u kterých byla zjištěna zvýšená koncentrace hyaluronanu, a to jak přímo v buňkách samotných, tak i v mezibuněčném stromatu. Není však zcela jasné, zdali jsou tato zjištěná množství hyaluronanu vlastní příčinou anebo spíše až důsledkem některého jiného patologického pochodu [12].

Při zmíněných procesech je účinek hyaluronanu na buněčné úrovni a následně i na úrovni tkáňové a orgánové zprostředkován vazbou na charakteristické receptory. Hlavním receptorem pro kyselinu hyaluronovou je molekula CD44 [13–16]. CD44 je transmembránový receptor všudypřítomný v lidském těle. Vazba hyaluronanu na tento receptor vede k celé řadě buněčných odpovědí, jako jsou přilnavost, organizace a obrat extracelulární matrix na povrchu buněčné membrány a zprostředkování migrace lymfocytů v průběhu zánětu. Tento receptor může existovat v celé řadě izoform [12, 17]. Jedním z receptorů, který se svojí funkcí a expresí podobá molekule CD44 je RHAMM. Ten narozdíl od CD44 není transmembránovým proteinem. Po navázání hyaluronanu je hlavní funkcí RHAMM zprostředkovat adhezi a buněčnou hybnost. Oba receptory se podílejí na regulaci přenosu buněčných signálů.

2.1.7 Cílená distribuce léčiv

Nosiče léčiv jsou v současné době stále více studovány v kontextu vývoje nových terapeutických systémů pro léčbu mnoha typů onemocnění. Tyto nosiče mají za úkol především zajistit prodlouženou cirkulaci účinných látek v krevním oběhu, řízenou aktivaci a účinek selektivně zaměřený na cílovou tkáň, soubor buněk (např. nádor), jednotlivou buňku nebo dokonce i buněčné kompartmenty. Nosiče léčiv mohou omezit nežádoucí účinky terapie, zajistit rozpustnost ve vodě nerozpustných aktivních látek a v neposlední řadě také potlačit rezistenci cílové tkáně k léčivu. Byla vyvinuta celá řada nosičů založených na rozpustných polymerech, liposomech, nanočásticích a polymerních micelách.

Největší pozornost je dnes zaměřena na vývoj nosičů kancerostatik a to zejména z důvodu vysoké společenské závažnosti nádorových onemocnění, která je dána jejich častým výskytem a dodnes mnohdy málo účinnou léčbou. Dnes užívaná protinádorová léčiva nejsou totiž dostatečně selektivní pro nádorovou tkáň, což se projevuje výraznou řadou nežádoucích účinků [18].

Jak již bylo zmíněno, hyaluronan se zdá být vhodnou látkou pro cílenou distribuci léčiv, jak už pro svoji biokompatibilitu, tak také kvůli jeho vazbě s receptorem CD44 [19, 20]. Hyaluronan je vysoce hydrofilní polymer s masivním hydratačním obalem. Proto jej nelze přímo využít pro přepravu nepolární látky. Jelikož má řada účinných léků hydrofobní charakter, musí být hyaluronan pro zmíněné použití hydrofobně modifikován, což ale může ovlivnit jeho biologickou aktivitu a kompatibilitu. Lepším způsobem je vazba hyaluronanu fyzikálními interakcemi s nějakým vhodným molekulárním partnerem, který zajistí rozpustnost hydrofobního léčiva.

Například kombinace hyaluronan-tenzid může být vhodným typem takových agregátů. V těchto systémech je hydrofobní léčivo solubilizováno v hydrofobních prostorech tenzidů (v micelách), zatímco hyaluronan zajišťuje vnější ochranu a biokompatibilitu celého systému a obstarává cílení systému.

2.2 Koloidní disperzní systémy

Disperzní soustava je taková soustava, která obsahuje alespoň dva druhy hmoty, přičemž jeden druh je rozptýlen ve druhém ve formě více nebo méně jemných částic. Rozptýlený druh se nazývá disperzní podíl, spojitý druh disperzní prostředí. Pod pojmem druh hmoty se rozumí složka nebo fáze. V roztocích představuje disperzní prostředí rozpouštědlo a disperzní podíl rozpuštěná látka. Převážná většina disperzí patří mezi vícesložkové soustavy [21, 22].

Povahu disperzního systému ovlivňuje celá řada faktorů. Především jde o velikost disperzních částic a počet fází v systému, dále pak tvar částic, skupenství disperzního prostředí a disperzního podílu, interakce mezi částicemi a disperzním prostředím, vzájemné interakce mezi částicemi či povrchové a elektrické vlastnosti částic.

Podle velikosti částic disperzního podílu jsou disperze děleny na několik typů, mezi nimiž je však plynulý přechod. Jedná se o

- analytické disperze s velikostí částic menší než 1 nm,
- koloidní disperze s velikostí částic od 1 nm do 1 μm ,
- mikrodisperze s velikostí částic od 1 μm do 10 μm a
- makrodisperze s velikostí částic nad 10 μm [21].

Částice koloidního systému se chovají stejným způsobem jako molekuly v pravých roztocích, což znamená, že vykonávají chaotický termický pohyb – Brownův pohyb. Vzájemnými srážkami i srážkami s molekulami disperzního prostředí mění koloidní částice svůj směr i rychlost pohybu. Intenzita Brownova pohybu roste se stupněm disperzity (tj. s převrácenou hodnotou rozměru disperzního podílu), protože se zvětšuje počet částic a tím také počet vzájemných srážek. Stejný vliv má vzrůst stupně disperzity na osmotický tlak vyvolaný částicemi.

Vlastností, která odlišuje koloidní soustavy od pravých roztoků je to, že způsobují rozptyl světla procházejícího roztokem. Světlo odrážející se od jednotlivých částic způsobuje, že jsme schopni vidět dráhu paprsku. Toto rozptylování světla se nazývá Tyndallův efekt [21].

Vzhledem k velké rozmanitosti je účelné rozdělovat koloidně disperzní systémy do tří skupin:

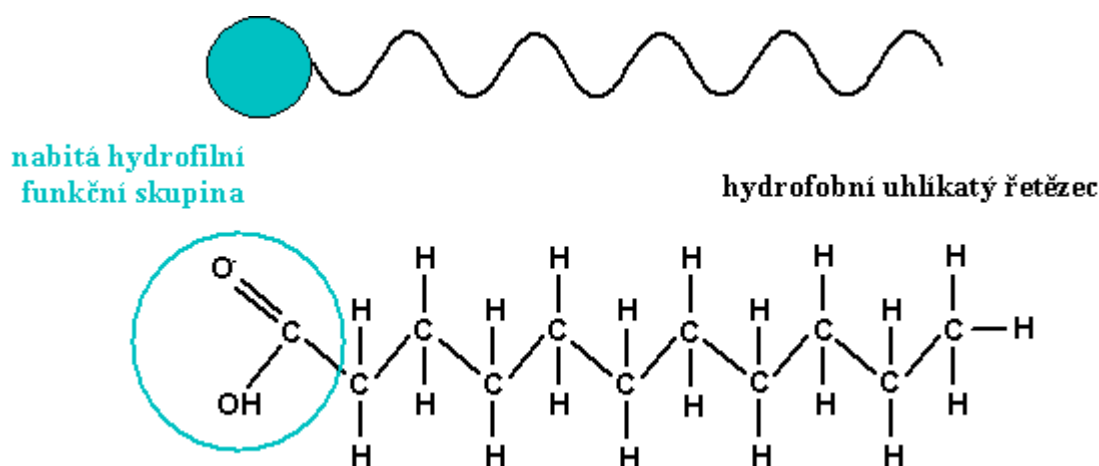
- *Lyofobní disperze* (koloidní disperze) – heterogenní systémy, v nichž disperzní podíl a disperzní prostředí představují dvě různé fáze. Tyto fáze jsou odděleny fázovým rozhraním, které výrazně ovlivňuje jejich vlastnosti. Vznikají z hrubých disperzí umělým dispergováním nebo z pravých roztoků srážením na částice koloidní velikosti. Jsou termodynamicky nestálé, samovolně zanikají.
- *Lyofilní koloidy* (koloidní roztoky) – homogenní koloidní systémy, v nichž disperzní podíl tvoří s disperzním prostředím jednu fázi. Jsou to pravé roztoky makromolekul, které vznikají samovolným rozpouštěním a jsou termodynamicky stálé. Samovolný vznik je podmíněn afinitou makromolekul k disperznímu prostředí.
- *Asociativní (micelární) koloidy* – vznikají samovolnou reverzibilní asociací nízkomolekulárních látek s amfifilní strukturou v pravém roztoku. Mezi molekulami v roztoku a vzniklými asociály se ustavuje rovnováha [21].

2.3 Asociativní micelární koloidy

Některé nízkomolekulární látky poskytují ve vhodném rozpouštědle ve velkých zředěních pravé roztoky, ale od určité koncentrace jejich molekuly asociují do té míry, že vytvářejí částice koloidních rozměrů. Tyto útvary se nazývají *micely* a látky, které se chovají tímto způsobem, označujeme jako micelární neboli asociativní koloidy [22].

2.3.1 Struktura micelárních koloidů

Schopnost vytvářet micely je podmíněna zvláštní strukturou molekul. Tato podmínka vyžaduje, aby molekula obsahovala hydrofilní skupiny, které svou velkou afinitou k rozpouštědlu zaručují značnou rozpustnost, a aby současně druhá část molekuly byla sama o sobě v daném prostředí nerozpustná, tedy hydrofobní. Takové molekuly se nazývají amfifilní.



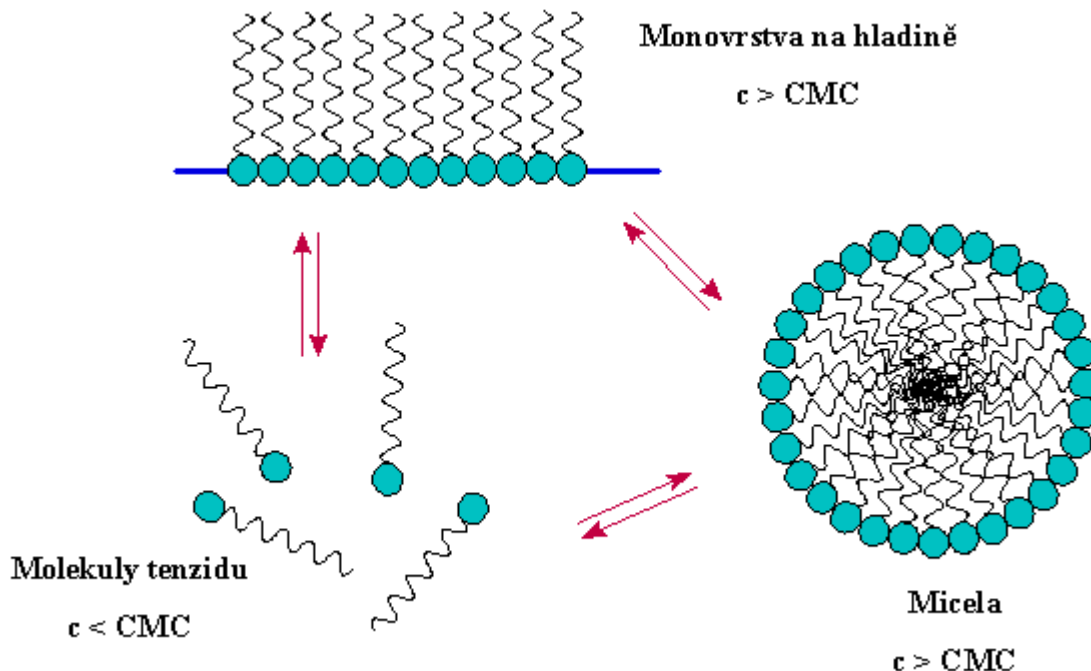
Obr. 5: Struktura molekuly tenzidu

Látky s výše popsanou strukturou jsou označovány jako povrchově aktivní látky (PAL) neboli tenzidy. Tyto látky jsou podle schopnosti disociovat ve vodném roztoku rozdělovány na ionogenní (aniontové, kationtové, amfoterní) a neionogenní neboli neutrální. Aniontové PAL disociují za vzniku povrchově aktivních aniontů. Nejvýznamnějšími představiteli této skupiny jsou alkalické soli vyšších mastných kyselin (přírozená mýdla). Kationtové PAL tvoří při disociaci ve vodě povrchově aktivní kationty. Typickým příkladem jsou soli čtyřsytných amonných bází – cetyltrimetylamonium bromid (CTAB). Současná přítomnost aniontových a kationtových PAL ve vodném roztoku obvykle není možná, neboť v takovém roztoku se z velkého kationtu a velkého aniontu vytváří velmi slabě disociující sůl o velké molární hmotnosti, která je prakticky nerozpustná. U amfoterních PAL náboj micely závisí na pH. Amfifilní neionogenní PAL nejsou schopné elektrolytické disociace. Skládají se z dlouhého uhlovodíkového řetězce s několika polárními, ale neionogenními skupinami na konci, které zajišťují rozpustnost těchto sloučenin [21].

2.3.2 Micely a kritická micelární koncentrace

Asociativní povrchově aktivní látky tvoří ve velkých zředěních pravé roztoky. Při určité koncentraci dojde v systému k samovolné agregaci molekul do útvarů koloidní velikosti. Hnací silou agregace jsou hydrofobní interakce. Jejich podstatou je poměrně značný vzrůst entropie (cca $140 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) při přechodu tenzidu z monomerního do agregovaného stavu. Vznikající útvary se nazývají *micely* a příslušná koncentrace, při které k agregaci dochází, se nazývá *kritická micelární koncentrace* (označována z angl. CMC). Pod touto koncentrací existují molekuly PAL v systému pouze ve formě jednotlivých molekul, nad ní všechny přidávané molekuly PAL asociují do micel. CMC je tedy nejvyšší možná koncentrace, při níž je PAL v roztoku v molekulové (iontové) formě [21].

Při postupném rozpouštění tenzidu se hydrofobní části amfifilních molekul snaží minimalizovat kontakt s vodným prostředím. Nejprve se tyto molekuly samovolně hromadí na povrchu kapaliny a orientují se hydrofobními částmi ven z roztoku a hydrofilními částmi do roztoku. V okamžiku, kdy je celá plocha povrchu tekutiny nasycena molekulami tenzidu, nemohou se už další molekuly v povrchové vrstvě hromadit. V této chvíli bylo dosaženo CMC. Po překročení CMC dochází již ke vzniku agregátů – *micel* (Obr. 6). Ve vodném (polárním) prostředí tvoří jádro micely navzájem propletené nepolární uhlovodíkové řetězce molekul PAL, které se stále snaží minimalizovat kontakt s vodným prostředím. Na vnějším povrchu micely jsou rozmístěny polární skupiny (hydrofilní části molekul, hydrofilní hlavy). Jde-li o ionogenní PAL, polární skupiny disociují. Vznikají nabité micely obklopené elektrickou dvojvrstvou tvořenou disociací vzniklými protiionty [21].



Obr. 6: Proces micelizace

Velikost a tvar micel závisí na koncentraci, teplotě, molekulární struktuře PAL, charakteru mezimolekulárních sil atd. Ve zředěných vodných roztocích nad CMC vznikají malé kulovité (sférické) agregáty, v koncentrovaných roztocích jsou přítomny i micely jiného tvaru. S rostoucí koncentrací roztoku se zvětšuje rozměr micel a uhlovodíkové řetězce se v nich stále více orientují navzájem rovnoběžně, až do vzniku laminárních micel složených ze dvou vrstev PAL, které jsou k sobě obráceny uhlovodíkovými řetězci a ionogenní skupiny směřují ven.

Zředěné roztoky micelárních koloidů se vyznačují typickým průběhem závislostí různých fyzikálních vlastností na koncentraci. Ty vykazují zlomy, které u jiných roztoků nepozorujeme. Tento zlom potvrzuje skutečnost, že v roztoku došlo při CMC k významným změnám. Existence těchto typických závislostí nám umožňuje využití rozličných metod k určení CMC, jakožto jednoho z nejdůležitějších hodnotících parametrů u asociativních koloidů. CMC se běžně stanovuje ze zlomu koncentrační závislosti povrchového napětí [23], dynamického rozptylu světla [24] a dalších fyzikálních parametrů.

Dnes je pro svou rychlost a jednoduchost velice populární metodou pro stanovení CMC metoda založená na měření fluorescence. Konkrétně například metodě využívající pyren a jeho deriváty jako fluorescenční sondy je kvůli vysoké citlivosti věnována vysoká pozornost. Je dobře známo, že optické vlastnosti fluorescenčních sond jsou silně ovlivňovány polaritou jejich prostředí. Pod CMC se budou sondy vyskytovat hlavně ve vodném prostředí, zatímco nad CMC jsou inkorporovány dovnitř micel. V případě nedostatečného objemu micely není fluorescenční sonda plně včleněna do hydrofobního prostoru, není úplně rozpuštěna v jádře micely. Změna prostředí sondy se projeví změnou intenzity vibračních pásů emisních či excitačních spekter a následně zlomem v koncentračních závislostech [23, 25–27].

2.4 Optické vlastnosti koloidních soustav

Optické vlastnosti koloidních soustav jsou silně závislé zejména na fyzikálních vlastnostech koloidních částic – především jejich velikosti, elektrické vodivosti a vlastní absorpci světla látkou tvořící disperzní fázi. Nejvíce informací z jevů spojených s interakcí světla s koloidními soustavami poskytují rozptyl a absorpce světla.

Čistý rozptyl světla nastává za podmínky, že vlnová délka světla λ je podstatně větší než koloidní částice v soustavě (o poloměru r), platí-li tedy podmínka $\lambda \gg r$. Je-li tomu naopak, dochází přednostně k odrazu světla a pak pozorujeme zákal (hrubé disperzní soustavy).

Pokud dochází pouze k rozptylu světla, zmenšení intenzity dopadajícího světla I_0 na hodnotu I při průchodu vrstvou o tloušťce x je dáno formálně vztahem:

$$I = I_0 \cdot \exp(-\tau \cdot x), \quad (1)$$

kde τ představuje turbiditu, která je mírou úhrnné energie rozptýlené při průchodu paprsku světla vrstvou suspenze o jednotkové tloušťce na všechny strany od tohoto paprsku.

Rozptyl světla je složitý jev, který zahrnuje podle okolností odraz, lom, ohyb a interferenci světla [21, 22, 25].

2.4.1 Dynamický rozptyl světla

Metoda dynamického rozptylu světla (DLS), nazývaná rovněž jako fotonová korelační spektroskopie (PCS) je v současné době široce používána pro stanovení velikosti koloidních částic. Obvykle jsou výsledky v přiměřené shodě s výsledky elektronového mikroskopu. Určité nesrovnalosti ve výsledcích mohou být přisouzeny např. rozdílu mezi hydrodynamickým poloměrem, který může zahrnovat solvatační obal či naadsorbovanou vrstvu na povrchu částic, a skutečným poloměrem. V případě polydisperzních systémů se musí vzít do úvahy pohyb částic rozdílných velikostí a korelační funkce má poté složitější formu.

Získaná průměrná velikost koloidních částic je vážena podle páté mocniny (tzv. Z-average), takže velké částice jsou v této hodnotě velmi nadhodnoceny a dokonce se může stát, že frakce malých částic se úplně ztratí ve velké intenzitě záření rozptýleného na větších částicích.

2.4.2 Princip DLS

Principem metody dynamického rozptylu světla je měření fluktuací intenzity světla rozptýleného molekulami či částicemi ve vzorku v průběhu času. Při rozptylu světla molekulou se rozptýlí část dopadajícího světla. Kdyby byla molekula stacionární, množství rozptýleného světla by bylo konstantní, ale jelikož všechny molekuly v roztoku difundují Brownovým pohybem vzhledem k detektoru, existují interference (pozitivní nebo negativní), které způsobují změnu intenzity.

Čím rychleji částice difundují, tím rychleji se mění intenzita rozptýleného světla. Rychlost těchto změn je tudíž přímo závislá na pohybu molekuly. Difúzi molekul v principu ovlivňují následující faktory:

- Teplota – čím vyšší je teplota, tím rychleji se molekuly pohybují
- Viskozita rozpouštědla – čím vyšší je viskozita rozpouštědla, tím pomaleji se molekuly pohybují
- Velikost molekul – čím větší jsou molekuly, tím pomaleji se pohybují

Jsou-li teplota a rozpouštědlo známy a konstantní, proměnlivost intenzity rozptýleného světla je přímo úměrná „velikosti“ molekuly. Tato veličina se nazývá *hydrodynamický poloměr* R_h . Tento poloměr je poloměrem koule, jejíž hydrodynamické chování je za dané teploty v daném rozpouštědle stejné jako chování sledované disperzní částice.

Jak již bylo uvedeno, fluktuace intenzity rozptýleného světla je závislá na velikosti částic. Okamžitou hodnotu fluktuace intenzity rozptýleného světla v čase t popisuje pro monodisperzní systém tzv. autokorelační funkce $g(t)$, která je definovaná vztahem

$$g(t) = \exp\left(\frac{-t}{t_c}\right), \quad (2)$$

kde t_c je relaxační čas. Relaxační čas je charakterizován jako doba potřebná k návratu fluktuace k průměrné hodnotě intenzity rozptýleného světla. Hodnotu relaxačního času lze vztáhnout k difúznímu koeficientu D rozptylujících částic prostřednictvím rovnice

$$t_c = \frac{1}{Dq^2}, \quad (3)$$

kde q je rozptylový vektor, jehož hodnota je funkcí vlnové délky dopadajícího záření, indexu lomu disperzního média n a úhlu θ , pod kterým je intenzita rozptýleného světla měřena:

$$q = \left(\frac{4\pi n}{\lambda} \right) \sin \frac{\theta}{2}, \quad (4)$$

Difúzní koeficienty měřených částic je potom možno převést na velikost částic pomocí Stokesovy-Einsteinovy rovnice:

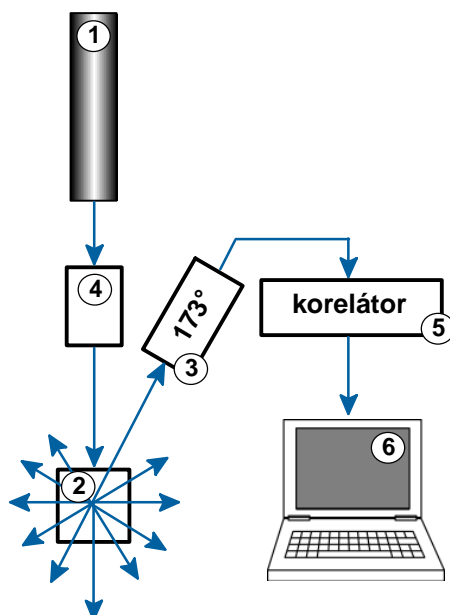
$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D}, \quad (5)$$

kde D je translační difúzní koeficient, k je Boltzmannova konstanta, T je teplota a η je viskozita disperzního prostředí [26–28].

2.4.3 Měření velikosti částic

Při měření velikosti částic se provádí měření Brownova pohybu, které se uvádí do vztahu s velikostí částic. Důležitým rysem Brownova pohybu pro DLS je to, že se malé částice pohybují rychle a velké částice se pohybují pomaleji. Měření Brownova pohybu se provádí osvětlením částic laserem a analyzováním fluktuací intenzity v rozptýleném světle. Výstupem měření je dle nastavení softwaru např. distribuce velikosti částic podle intenzity. Intenzita je uváděna v procentech a udává, jaká část intenzity paprsku dopadajícího na částice je rozptylována.

Typický systém DLS se skládá ze šesti hlavních komponent. Především se používá *laser* (Obr. 7 – část 1) jako zdroj světla pro osvětlení částic vzorku uvnitř *cely* (Obr. 7 – část 2). Většina laserových paprsků prochází přímo skrz vzorek, ale některé jsou rozptýlené částicemi ve vzorku. *Detektor* (Obr. 7 – část 3) se používá pro měření intenzity rozptýleného světla. Detektor je v našem případě umístěn do polohy v úhlu 173° (detekce zpětného rozptylu).



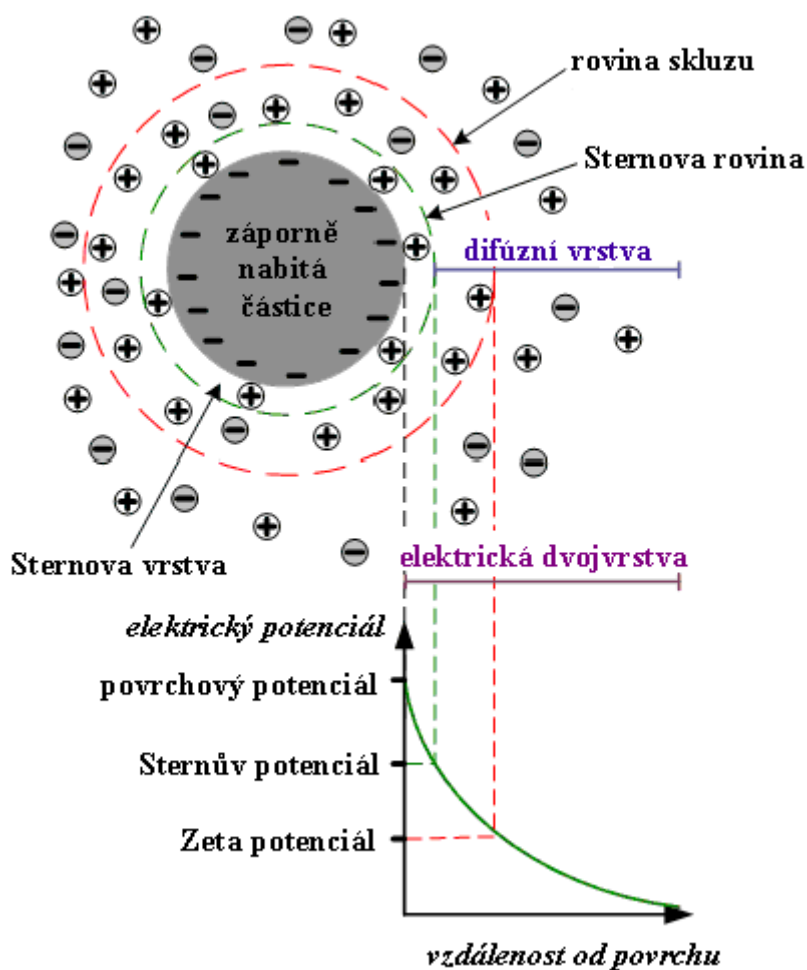
Obr. 7: Schéma zařízení Zetasizer Nano pro měření velikosti částic

Intenzita rozptýleného světla musí být pro detektor uvnitř určitého rozsahu, aby ji mohl úspěšně změřit. Je-li detekováno příliš mnoho světla, pak se detektor přetíží. Aby se tato překážka překonala, používá se pro snížení intenzity laseru "zeslabovač" (*attenuator*) (Obr. 7 – část 4), který tudíž snižuje i intenzitu rozptylu. Signál intenzity rozptylu pro detektor projde na desku digitálního zpracování signálu nazvanou *korelátor* (Obr. 7 – část 5). Korelátor srovnává intenzitu rozptylu v několika po sobě jdoucích časových intervalech, aby odvodil rychlost, kterou se intenzita mění.

Tato informace z korelátoru pak přejde do *počítače* (Obr. 7 – část 6), kde speciální software analyzuje data a odvozuje informace o velikosti [29].

2.5 Elektrické vlastnosti koloidních soustav

Přítomnost částic disperzní fáze a široce rozvinutého fázového rozhraní v disperzních soustavách podmiňuje zvláštní ráz jejich elektrických vlastností a především vznik tzv. elektrokinetických jevů. Podobně jako malý jednoduchý ion kolem sebe vytváří iontovou atmosféru protiiontů, tak se i kolem nabitě koloidní částice seskupují malé ionty opačného znaménka, takže na povrchu této částice vznikají dvě nabitě vrstvy, tzv. *elektrická dvojvrstva*.



Obr. 8: Elektrická dvojvrstva koloidních částic

V elektrické dvojvrstvě lze vymezit dvě základní části. Kompaktní část bližší k povrchu, kde působí adsorpční síly, a vzdálenější difúzní část, kde lze tyto adsorpční síly zanedbat. Vzhledem k povrchovému náboji koloidních částic existuje potenciálový rozdíl mezi jejich povrchem a roztokem. Lze rozlišit dva druhy potenciálových rozdílů. Prvním z nich je elektrokinetický potenciál, jehož hodnota je dána celkovým potenciálovým rozdílem mezi povrchem částice a objemem kapaliny. Je odpovědný za jevy spojené s vedením elektrického proudu a za membránové potenciály. Druhým potenciálem je *elektrokinetický potenciál* (*ζ potenciál*, *zeta potenciál*), jímž se rozumí potenciálový rozdíl mezi objemem kapaliny a difúzní částí elektrické dvojvrstvy.

Podle Sterna je první vrstva, a s ní i několik vrstev protiiontů, přitahována k povrchu jak elektrostatickými, tak adsorpčními silami. Část protiiontů tedy zůstává v blízkosti povrchu. V této adsorpční vrstvě dochází k prudkému poklesu elektrického potenciálu. Zbylé protiionty, nutné ke kompenzaci náboje iontů určujících potenciál, vytváří v důsledku tepelného pohybu difúzní část elektrické dvojvrstvy. Po přidavku elektrolytu do systému se bude difúzní vrstva stlačovat a stále více protiiontů se ocitne v adsorpční vrstvě. Zeta potenciál se bude snižovat, až dosáhne téměř nulové hodnoty. Při ředění systému se difúzní vrstva naopak rozšiřuje a zeta potenciál roste.

Elektrický náboj dvojvrstvy charakterizuje a zároveň ovlivňuje stabilitu koloidních systémů. Zeta potenciál, který odpovídá náboji difúzní části dvojvrstvy, je právě mírou tohoto náboje [25]. Obecná dělicí čára mezi stabilním a nestabilním koloidním systémem se zpravidla bere ± 30 mV. Částice se zeta potenciálem kladnějším než +30 mV, nebo zápornějším než -30 mV se normálně považují za stabilní.

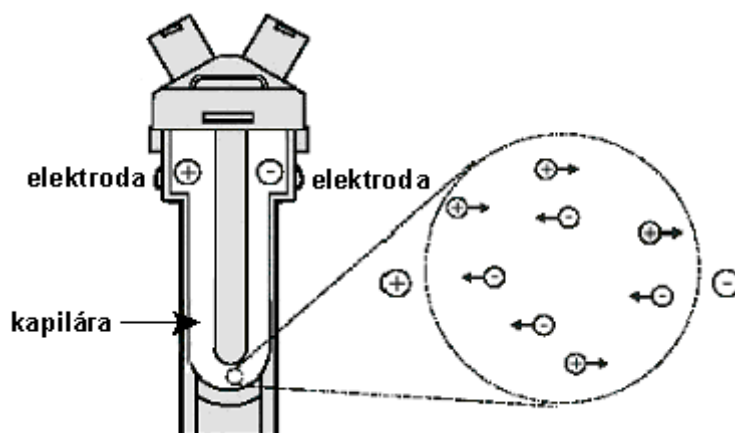
2.5.1 Měření potenciálu zeta

Potenciál zeta je při měření vypočten stanovením elektroforetické pohyblivosti a potom použitím Henryho rovnice:

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta}, \quad (6)$$

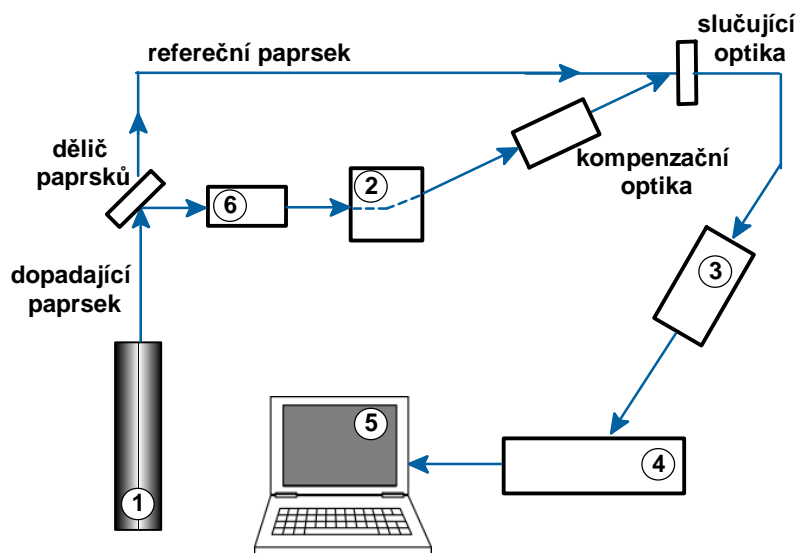
kde U_E představuje elektroforetickou mobilitu, ε je dielektrická konstanta, z je zeta potenciál, η je viskozita rozpouštědla a $f(ka)$ vyjadřuje Henryho funkci, která je charakteristická pro dané prostředí. Pro určení $f(ka)$ se obecně používají jako aproximace dvě hodnoty – buď 1,5 pro polární média nebo 1,0 pro nepolární.

Elektroforetická pohyblivost se získá provedením elektroforézy vzorku. Základem klasického mikroeletroforetického systému je cela s elektrodami na každém konci, na které je aplikovaný potenciál. Částice se pohybují směrem k elektrodě s opačným nábojem, jejich rychlost se měří a vyjádří se v jednotkách intenzity pole jako jejich pohyblivost. Rychlost částic se měří metodou laserové dopplerovy velocimetrie, při které se světlo rozptýlené v úhlu 17° kombinuje s referenčním paprskem. To vyvolává kolísající signál intenzity, kde poměr fluktuace je úměrný rychlosti částic [29].



Obr. 9: Princip pohybu částic při měření elektroforetické pohyblivosti [29]

Systém pro měření potenciálu zeta zahrnuje šest hlavních komponent. Jako světelný zdroj světla je používán *laser* (Obr. 9 – část 1), pro osvětlení částic ve vzorku. Pro měření potenciálu zeta je zdroj světla rozdělen, aby poskytoval dopadající a referenční paprsek. Laserový paprsek prochází středem *kyvety* (Obr. 9 – část 2) se vzorkem, a detekuje se rozptýl v úhlu 17° . Když se na kyvetu aplikuje elektrické pole, všechny částice pohybující se v měřeném objemu způsobí, že detekovaná intenzita světla kolísá s frekvencí úměrnou rychlosti částic. *Detektor* (Obr. 9 – část 3) odesílá tuto informaci na *digitální procesor signálu* (Obr. 9 – část 4). Informace následně přejde do *počítače* (Obr. 9 – část 5), kde je pomocí softwaru vytvořeno frekvenční spektrum, ze kterého se následně počítá elektroforetická pohyblivost, a tudíž i potenciál zeta. Pro zajištění ideální intenzity rozptýleného světla v kyvetě se používá zeslabovač (Obr. 9 – část 6) [29].



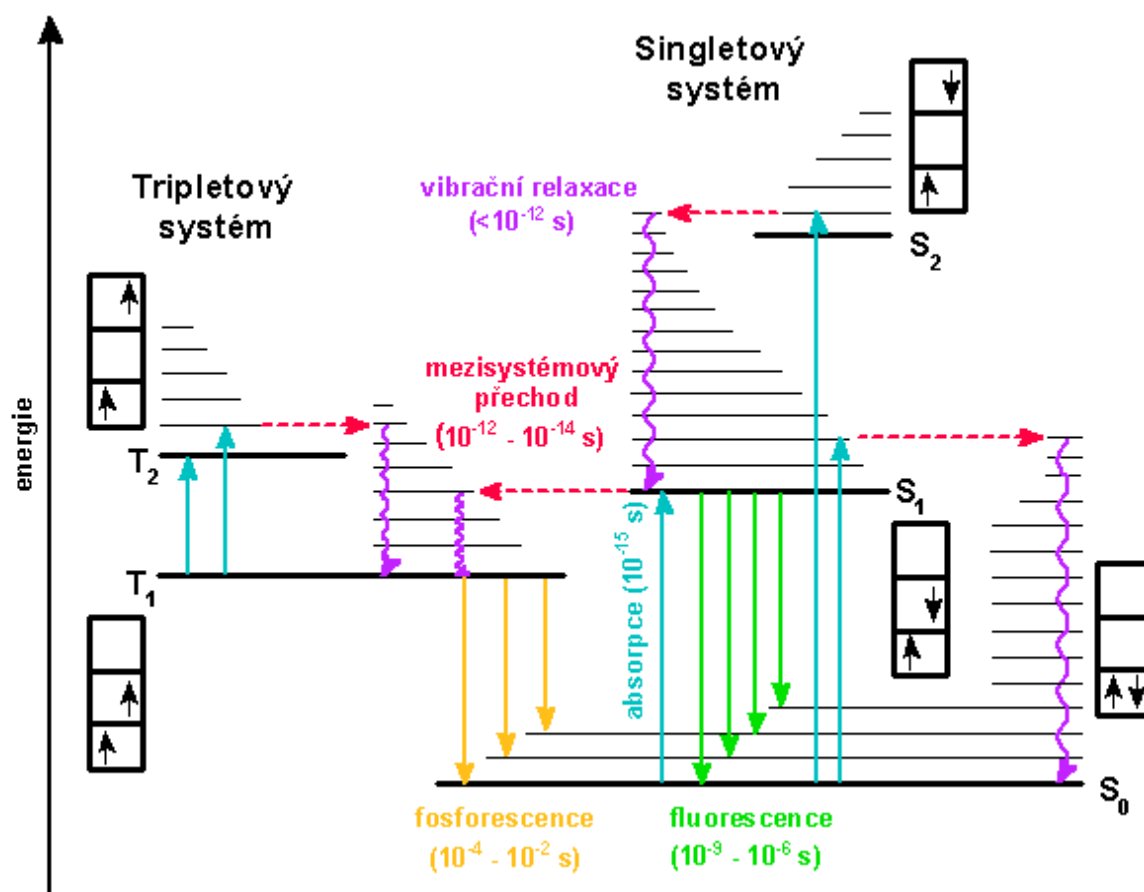
Obr. 10: Schéma zařízení Zetasizer Nano pro měření potenciálu zeta

2.6 Fluorescence

2.6.1 Princip fluorescence, doba života a kvantový výtěžek fluorescence

Po absorpci světla organickou molekulou v základním stavu (S_0) dojde k excitaci elektronu, který přeskočí z nízko ležícího orbitalu do nejbližšího volného orbitalu s vyšší energií. Tímto způsobem může dojít k vytvoření buď singletového nebo tripletového excitovaného stavu. V případě singletového stavu (S_1) jsou spiny obou elektronů antiparalelní. Vytvoření takového stavu je z kvantově-mechanického hlediska nejpravděpodobnější. V případě tripletového stavu (T_1) jsou spiny obou elektronů orientovány paralelně.

Procesy, které se objevují mezi absorpcí a emisí světla jsou obvykle ilustrovány pomocí Jabloňského diagramu (Obr. 11), který také znázorňuje molekulární procesy, k nimž může dojít v excitovaném stavu. Zářivé procesy jsou charakterizovány vyzářením fotonu a jsou v diagramu označeny jako přímé šipky. Nezářivé procesy se uskutečňují mezi vibračně-rotačními hladinami různých elektronových stavů, nemění se při nich celková energie systému, a tudíž nedochází k emisi záření, nýbrž jen ke zvýšení tepelné energie systému. V diagramu jsou nezářivé procesy označeny vlnovkami.



Obr. 11: Jabloňského diagram

Jakmile je molekula excitována po absorpci fotonu, může se zbavit přebytečné energie, a tím se vrátit do základního stavu různými deexcitačními procesy. Jedná se buď o fotochemické reakce, nebo o nezářivé přechody, při kterých se zvýší tepelná energie systému. Nejdůležitější jsou však procesy zářivé, při kterých dochází k emisi světla, což znamená vyzáření světelného kvanta. Obecně se tyto procesy nazývají luminiscence. Luminiscence je formálně rozdělena do dvou kategorií – fosforescence a fluorescence – v závislosti na povaze excitovaného stavu. Fosforescence je přechod z energeticky vyššího triplexového stavu T_1 do energeticky nižšího stavu S_0 . Tento přechod je spinově zakázán, a proto probíhá emise pomalu. Fluorescence je důsledkem spinově dovoleného přechodu obvykle z rovnovážné hladiny stavu S_1 do některé vibrační hladiny základního stavu S_0 .

Dalšími cestami které konkurují fluorescenci jsou např. vnitřní konverze, nezářivé přechody (případně následované fluorescencí), intramolekulární přenos a konformační změny. Dále mohou fluorescenci také konkurovat interakce s jinými molekulami v excitovaném stavu. Příkladem takových interakcí mohou být přesuny elektronů a protonů, přenos energie nebo tvorba excimeru nebo exciplexu. Tyto deexcitační dráhy mohou konkurovat fluorescenční emisí, pokud probíhají v časovém měřítku srovnatelném s průměrnou dobou, během které se molekuly vyskytují v excitovaném stavu. Fluorescence je však nejpravděpodobnějším deexcitačním procesem. Lze ji pozorovat po celou dobu buzení, ale po jeho ukončení u většiny látek prakticky ihned zmizí.

Doba života (τ_0) fluorescence je průměrný čas mezi jeho excitací a návratem do základního stavu; je velmi důležitou vlastností fluoroforů a vyjadřuje se vztahem

$$\tau_0 = \frac{1}{\sum_i k_i}, \quad (7)$$

kde k_i je rychlostní konstanta reprezentující deaktivaci procesy.

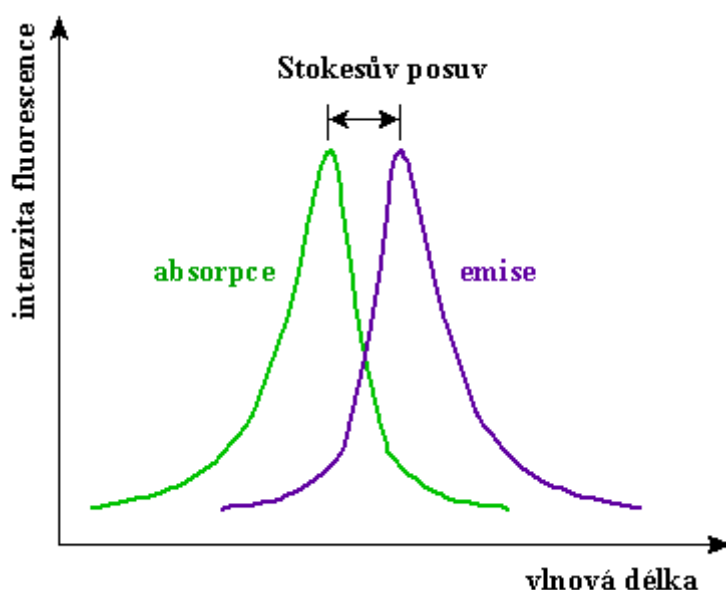
Druhou nejdůležitější vlastností fluoroforů je *kvantový výtěžek fluorescence* (Φ_F). Jedná se o podíl intenzity fluorescence I_F a intenzity absorbovaného světla I_A :

$$\Phi_F = \frac{I_F}{I_A} = \frac{k_f}{\sum_i k_i}, \quad (8)$$

kde k_f značí rychlostní konstantu fluorescence [30, 31].

2.6.2 Emisní a excitační spektrum fluorescence

Každá fluoreskující molekula má dvě charakteristická spektra – emisní a excitační. *Excitační spektrum* je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce (nebo energii, vlnočtu, či frekvenci) při konstantní vlnové délce emitovaného záření. Vyjadřuje relativní účinnost různých vlnových délek excitujícího záření. Excitační spektrum by mělo být shodné se spektrem absorpčním, ale ve skutečnosti se od sebe liší, protože excitační spektrum obsahuje pouze ty pásy absorpčního spektra, kde dochází k zářivé deexcitaci, tedy vzniku fluorescence. *Emisní spektrum* je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce (nebo energii, vlnočtu, či frekvenci) při konstantní vlnové délce budícího záření. Emisní spektrum je charakteristické pro dané sloučeniny. Bývá zrcadlovým obrazem spektra absorpčního, což je způsobeno tím, že absorpce i emise z odpovídajících si vibračních hladin mají stejnou relativní pravděpodobnost. Rozdíl energií mezi maximy absorpčního a emisního pásu se nazývá *Stokesův posuv*.



Obr. 12: Zrcadlová symetrie absorpčního a emisního pásu, Stokesův posuv

2.6.3 Zákony a pravidla pro fluorescenci

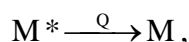
Fluorescence je řízena několika pravidly. Prvním z nich je *Stokesův zákon*, který říká, že vlnová délka luminiscenční emise při fotoluminiscenci je vždy větší nebo rovna vlnové délce excitačního světla ($\lambda_{em} \geq \lambda_{ex}$). V praxi to znamená, že excitační světlo ztratí část své energie, což se projeví prodloužením vlnové délky emitovaného záření.

Druhým pravidlem je *Kashovo pravidlo*, podle něhož dochází před emisí fluorescenčního kvanta k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, takže nastává fluorescenční přechod z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu S_1 . Důvodem je, že energetický rozdíl mezi vyššími excitovanými stavy a stavem S_1 je malý, nezářivé přechody z těchto stavů do základního stavu probíhají velmi rychle.

Třetím principem je *Vavilovův zákon*, který tvrdí, že kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu složitých molekul v roztoku nezávisí na vlnové délce budícího záření. Z toho vyplývá obecná vlastnost fluorescence a to, že emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitace.

2.6.4 Zhášení

Zhášení fluorescence lze definovat jako bimolekulární proces, který snižuje kvantový výtěžek fluorescence bez změny fluorescenčního spektra. Může být důsledkem různých procesů odehrávajícími se různými mechanismy. Jejich základní princip vystihuje obecné schéma:



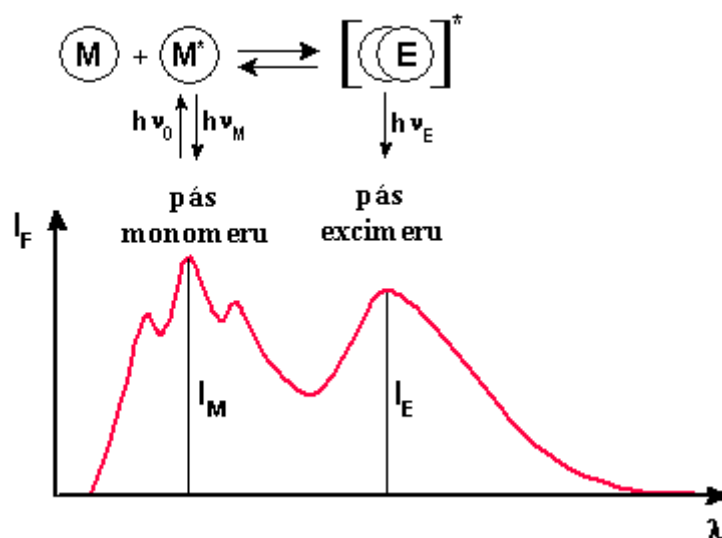
kde M^* vyjadřuje excitovaný stav molekuly, M základní stav molekuly a Q označuje zhášec.

Srážkové (dynamické) zhášení nastává, když je fluorofor v excitovaném stavu deaktivován (tzn. navrací se nezářivě do základního stavu) při srážce s molekulou zhášeče. Molekuly nejsou při tomto procesu chemicky změněny na rozdíl od *statického zhášení*, kdy se po

kontaktu fluoroforu a zhášedla vytváří nefluorescenční komplex. *Samozhášení* je zhášení fluoroforu jím samotným; nastává např. při vysokých koncentracích fluoroforu [30, 31].

2.6.5 Tvorba excimeru

Některé fluorofory, z nichž nejznámějším příkladem je pyren, mohou interagovat nejen s rozpouštědly, ale také sami navzájem. Komplexy vzniklé tímto způsobem se nazývají excimery. Excimer je dimer v excitovaném stavu. Jedná se o stechiometrický komplex, který je vytvářen při srážce mezi excitovanou molekulou a stejnou neexcitovanou molekulou. Schéma tvorby excimeru je vyobrazeno na Obr. 13.



Obr. 13: Schéma tvorby excimeru a odpovídající pásy v ukázkovém spektru

Excimer je charakterizován v emisním spektru vlastním pásem. Emisní pás excimerové fluorescence je posunut k vyšším vlnovým délkám ve srovnání s fluorescencí izolovaných molekul. Na rozdíl od monomerního emisního pásu nevykazuje excimerový pás vibrační strukturu. Intenzita fluorescence excimeru v emisním spektru roste na úkor fluorescence monomeru [30].

Pokud dochází v systému se zvyšováním koncentrace látky ke snižování fluorescence, je za zhášení fluorescence zodpovědná např. právě tvorba excimeru. Funkci zhášeče na sebe přebírá samotná molekula fluoreskující látky (např. pyren). Zhášení vlivem tvorby excimeru je tedy druhem samozhášení.

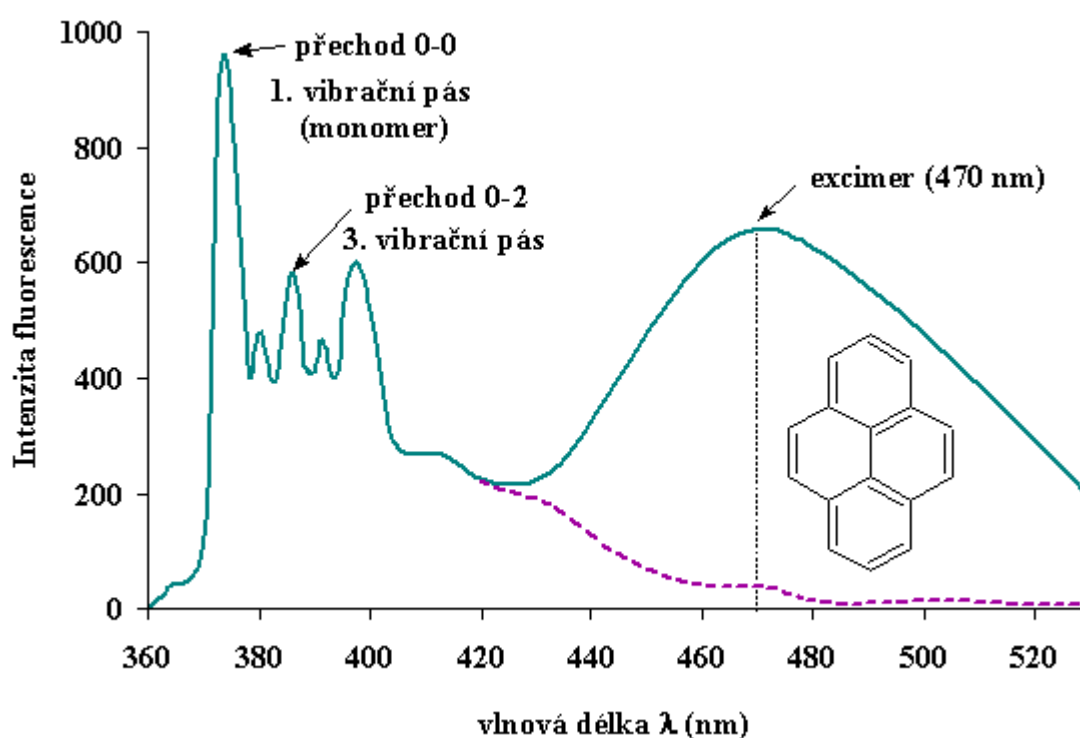
Vytváření excimeru je difúzně kontrolovaný bimolekulový proces, který se řídí kinetikou 2. řádu. Kinetika 2. řádu je závislá na difúzi, která je nepřímě úměrná viskozitě prostředí. Poměr intenzity fluorescence excimeru a monomeru je tedy ukazatelem viskozity prostředí, ve kterém se právě nachází fluorescenční sonda (např. pyren) [32].

2.6.6 Fluorescenční sonda – pyren

Fluorescenční sondy jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti. Volba fluorescenční sondy je klíčovou součástí experimentu ve fluorescenční spektroskopii, neboť právě její vlastnosti umožňují získat potřebné informace.

Pyren je polyaromatický uhlovodík s vysokou symetrií a s unikátní reakcí na polaritu svého okolí. Má v koloidních roztocích prakticky vždy dobře rozlišenou vibrační strukturu emisního

spektra. Přejchod 0-0 je závislý na polaritě okolí a je lokalizován u vlnové délky 373 nm. Referenčním pásem je přechod 0-2 u vlnové délky 384 nm. Poměr intenzity fluorescence maxim těchto pásm je obrazem polarity okolí pyrenu. Pro polární prostředí je hodnota poměru v rozsahu 1,25–2,0, pro nepolární (uhlovodíkové) prostředí se hodnota vyskytuje v rozsahu 0,57–0,61 [33]. Hodnoty pro polární prostředí jsou typické pro výskyt pyrenu ve vodném prostředí. Hodnoty pro nepolární prostředí jsou typické pro případ, kdy je pyren již plně solubilizován v kompaktních micelách. Tyto micely svým tvarem, velikostí i pevností nedovolují polárnímu prostředí difundovat do jejich vnitřního prostoru. V micelárním prostředí je hodnota poměru v rozsahu 1,1–1,5 [33]. Tento rozsah hodnot naznačuje, že pyren je již lokalizován v micelách, které ještě nejsou příliš pevné ani kompaktní a dovolují polárnímu prostředí difundovat do jádra a zvyšovat tím polaritu daného prostředí [34–36].



Obr. 14: Struktura molekuly pyrenu a vibrační struktura emisního spektra pyrenu

Pyren tvoří excimer s emisním maximem při 470 nm. Intenzita fluorescence excimeru je přímo úměrná pravděpodobnosti tvorby excimeru. Při koncentraci tenzidu pod CMC je pravděpodobnost tvorby excimeru velmi nízká. Při postupném zvyšování koncentrace tenzidu až na koncentraci blížíící se CMC, kdy se právě začínají v roztoku tvořit micely, se pyren začíná lokálně koncentrovat. Pravděpodobnost srážky dvou molekul pyrenu v jedné micelle se zvyšuje. Zvyšuje se tedy také pravděpodobnost tvorby excimeru a intenzita fluorescence excimerového pásu roste. S dále rostoucí koncentrací tenzidu, resp. micel v roztoku, pravděpodobnost obsazení micel dvěma molekulami pyrenu zase klesá, protože daná koncentrace pyrenu je již pod úrovní koncentrace micel v roztoku [37].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Nosiče léčiv jsou v současnosti stále více studovány v kontextu vývoje terapeutických systémů pro léčbu mnoha typů onemocnění. Tyto nosiče by měly především umožnit prodlouženou cirkulaci účinných látek v krevním řečišti, řízenou aktivaci a účinek selektivně zaměřený na cílovou tkáň. Tím lze omezit nežádoucí účinky terapie, zajistit rozpustnost ve vodě nerozpustných aktivních látek apod. Cílený transport léčiv je založen na obecném postupu, kdy nanočástice v sobě enkapsuluje léčivo. Přitom částice sama nebo rozpoznávací elementy na jejím povrchu umějí na základě specifických receptorů na povrchu buňky najít to pravé místo pro účinek [18, 38]. Byla vyvinuta celá řada nosičů, založených na rozpustných polymerech, liposomech, dendrimerech [39] a polymerních micelách [35, 39, 40].

V neposlední řadě je v současné době také uvažováno o využití interakcí tenzidů a polyelektrolytů jako vhodného způsobu přípravy cílených nosičů léčiv [1, 2]. Takové systémy jsou spojením výhod obou látek. Tenzid v těchto systémech vytváří hydrofobní prostor, ve kterém je možné solubilizovat léčivo, polyelektrolyt zajišťuje vnější ochranu agregátů a cílení na specifické místo v organismu. Zmíněný model je však značně zjednodušený a je velmi důležité jeho bližší prozkoumání, především pak podmínky interakce mezi komponentami a stabilita agregátů.

Jako velmi vhodný polyelektrolyt se již dlouhá léta jeví hyaluronan [41–43], díky jeho biokompatibilitě, unikátním chemickým a fyzikálním vlastnostem a schopnosti interagovat s receptory na povrchu buněk. V komplexech hyaluronan-tenzid se projevují nejen elektrostatické ale také hydrofobní interakce a systém je tudíž více stabilní. Interakcemi tenzidů s polyelektrolyty, včetně hyaluronanu se zabývají vědci z celého světa již řadu let [44]. Podmínkami a problémy interakcí tenzidů s hyaluronanem se zabývali **Thalberg, K. a spol.** [45, 46]. Byly zkoumány interakce mezi sodnou solí kyseliny hyaluronové a kationtovými tenzidy s různou délkou řetězce. Systémy byly zkoumány pomocí metod fázové separace, měření vodivosti, NMR a pomocí solubilizačních experimentů. Bylo zjištěno, že navázání tenzidů na polymer začíná při koncentraci tenzidu až o několik řádů nižší než je jeho kritická micelární koncentrace. V systému tedy postupným přidáváním tenzidu dochází k navázání molekul tenzidu na hyaluronan, dalšími přísadami tenzidu se příslušné agregáty stabilizují a teprve po dalším přísadku tenzidu se v roztoku začínají tvořit i volné micely. Micely vázané na řetězce hyaluronanu mají menší velikost než odpovídající volné micely. Interakce tenzidů a hyaluronanu je velmi závislá na délce řetězce tenzidu, ale v podstatě nezávislá na molekulové hmotnosti polymeru nad určitou minimální hodnotou.

Interakcemi tenzidů s hyaluronanem se dále zabývali **Yin, D. a spol.** [47]. Byly zkoumány možné interakce hyaluronanu a tenzidů, a to aniontových i neionogenních, pomocí metody fluorescenční spektroskopie. Dále byl také zkoumán vliv dalších sacharidů na příslušné interakce. **Xu, J. a spol.** [48] zkoumali systém kationtový tenzid-hyaluronan metodami dynamického rozptylu světla, měření zeta-potenciálu, mikroskopie a turbidity. Výsledky daných studií potvrdily, že dané systémy vznikají především elektrostatickými interakcemi a že průběh navázání tenzidu na řetězce hyaluronanu je podmíněn molárním poměrem jednotlivých složek. Samovolná agregace složek v systému vede k tvorbě micelární agregátů typu „core-shell“.

Stabilita a solubilizační vlastnosti agregátů biopolymer-tenzid jsou důležitými parametry pro jejich další využití. Oba tyto parametry je možno vyhodnotit pomocí fluorescenční

spektroskopie, kdy je hydrofobní léčivo představováno hydrofobní fluorescenční sondou. Touto problematikou se zabývají odborníci z celého světa [49–51]. Z fluorescenčních sond je snad nejpoužívanější pyren [52–55]. Pyren je z hlediska vlastností jeho emisního spektra považován za sondu se schopností charakterizovat polaritní úroveň jeho blízkého okolí, čímž je vhodnou sondou ke studiu procesu micelizace a agregace v systému hyaluronan-tenzid. Velmi dobře rozlišená vibrační struktura emisního spektra je vysoce závislá na polaritě rozpouštědla. Změny ve vibrační struktuře nastávají v celém spektru, avšak nejvýznamnější rozdíly závislé na polaritě prostředí fluorescenční sondy se vyskytují u vrcholu při 373 nm. Vrchol při 384 nm je využíván jako referenční pás. Vyjádřením poměru intenzity fluorescence při těchto dvou vrcholech získáváme parametr velmi citlivý na polaritu rozpouštědla.

Wilhelm a spol. [56] a následně také *Astafieva a spol.* [57] poukázali na to, že poměr intenzity fluorescence dvou nejvýznamnějších vrcholů emisního spektra není pravým ukazatelem pro zjištění počátku micelizace, protože je tato hodnota závislá na vlnové délce excitace. Takže při excitační vlnové délce např. 339 nm by se poměr posunul ve prospěch pyrenu v hydrofobním prostředí (v micelách), kdežto při 333 nm je hodnota silně nakloněna k pyrenu ve vodném prostředí. Autoři ukázali, že koncentrační závislost poměru intenzit fluorescence při 333 nm a 338 nm excitačního fluorescenčního spektra je citlivější k pravému počátku micelizace.

Dalšími vhodnými technikami pro studium stability a velikostních charakteristik koloidních soustav je metoda dynamického rozptylu světla a měření zeta-potenciálu. Tyto metody byly prostudovány v široké oblasti různých koloidních částic [49, 58–61]. Studium bylo provedeno v neposlední řadě také u nanočástic uvažovaných k cílené dopravě aktivních látek [35, 62, 63].

Je dobře známo, že tenzidy vytvářejí agregáty zvané micely. Počátek tvorby micel charakterizuje kritická micelární koncentrace (CMC). Ta je závislá na teplotě a pH. Měřením povrchového napětí bylo zjištěno, že CMC se v rozmezí pH 7–10 mění až o jeden řád a s rostoucí teplotou dochází k rychlejšímu poklesu povrchového napětí roztoku [64]. Dále bylo měřením měrné vodivosti zjištěno, že CMC vlivem teploty nejprve klesá a pak zase roste [65, 66]. Je tedy zřejmé, že tvorba micel povrchově aktivních látek je ovlivněna teplotou i dalšími podmínkami přípravy. Je tedy logické, že by například teplota mohla ovlivňovat i přípravu komplexů polymer-tenzid. Tato problematika byla zkoumána pomocí fluorescenční spektroskopie na směsích micel amfifilních blokových polymerů s tenzidy v závislosti na obsahu tenzidu ve směsi. Bylo zjištěno, že s rostoucí teplotou dochází k poklesu hodnot CMC a s rostoucím obsahem tenzidu ve směsi s polymerem dochází k mírnému nárůstu [67].

I přes velký zájem o hyaluronan a jeho komplexy v současné době existuje jen velmi málo studií zabývajících se vlivem podmínek přípravy a konkrétními kroky přípravy tohoto systému. Ač je logické, že by příprava systému měla mít vliv na jeho výsledné vlastnosti, včetně stability či solubilizačních vlastností, což dokazují dílčí studie, včetně méj bakalářské práce [68], je tato problematika dosud velmi přehlížena a opomíjena.

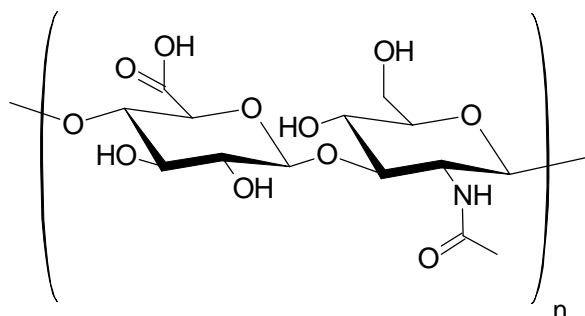
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiály

Hyaluronan sodný

Hya $M_w = 73$ kDa, CPN spol. s.r.o., šarže 071207-P1

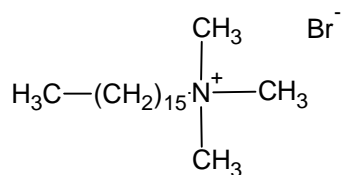
Hya $M_w = 1,46$ MDa, CPN spol. s.r.o., šarže 141008-E1



Tenzid

CTAB (cetyltrimetylamonium bromid), $M_w = 364,46$ g·mol⁻¹,

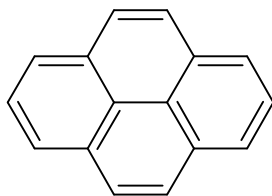
CAS: 57-09-0, Sigma, Ultra $\geq 98,0$ % šarže 117K0732



Fluorescenční sonda

Pyren, CAS: 129-00-0, Fluka, puriss p.a. for fluorescence,

šarže 129000



Rozpouštědla

Aceton, Penta, čistota 99,5 %,

Mili-Q voda (Milipore Academic)

Ostatní chemikálie

NaCl (chlorid sodný), CAS: 7647-14-5, LachNer s.r.o., p.a.,

šarže 30453

4.2 Přehled experimentů

Nejprve byly navrženy experimenty pro porovnání vlivu teploty na stabilitu a solubilizační vlastnosti komplexů hyaluronan-tenzid. Rozhodující byla při přípravě systémů teplota při směšování jednotlivých roztoků.

Pro experimenty byly vybrány tři konkrétní teploty: běžná laboratorní teplota (25 °C), zvýšená teplota, která představovala fyziologickou teplotu (37 °C) a vysoká teplota (70 °C). Byly také provedeny experimenty pro zhodnocení vlivu zmrazení hotových systémů na jejich stabilitu.

Experimenty byly prováděny dvěma metodami zohledňujícími způsob, jakým byla do systému zavedena fluorescenční sonda. Jako fluorescenční sonda byl zvolen pyren. V případě první metody byly zahřáté zásobní roztoky CTAB, hyaluronanu a prostředí nejprve smíchány a teprve poté dávkovány do vialek, na jejichž stěnách byl nanesen pyren standardním způsobem. Při druhé metodě byl nejprve pyren předsolubilizován v zásobním roztoku CTAB. Následně byly všechny zásobní roztoky opět zahřáty a poté smíchány, čímž byl připraven konečný systém.

Experimenty byly provedeny se čtyřmi různými kombinacemi hyaluronanu a tenzidu. Koncentrace jednotlivých látek byly vybrány na základě vlastní bakalářské práce [67], v níž byl proveden a diskutován výběr vhodné kombinace těchto látek pro další experimenty s přihlédnutím k využití ve fluorescenční spektroskopii. Konkrétně byl tedy použit nativní hyaluronan o koncentraci $15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a tenzid CTAB o koncentraci $0,6 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Prostředí jednotlivých systémů bylo tvořeno buď vodou (Mili-Q) nebo roztokem NaCl o koncentraci $0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

4.3 Příprava systémů

4.3.1 Zahřáté roztoky dávkovány do vialek s pyrenem

Nejprve bylo do čistých vialek napipetováno potřebné množství zahřátého zásobního roztoku CTAB o koncentraci $6 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ tak, aby výsledná koncentrace ve vzorku činila $0,6 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Poté byl napipetován do téže vialky zahřátý zásobní roztok hyaluronanu o koncentraci $0,1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Výsledná koncentrace hyaluronanu ve vzorku činila $15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Nakonec bylo do vialky napipetováno potřebné množství zahřáté Mili-Q vody nebo roztoku NaCl o koncentraci $0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Celkový objem vzorku byl 5 ml. Teploty všech zásobních roztoků před směšováním byly 25 °C, 37 °C nebo 70 °C.

Do jiných vialek byl mezitím napipetován zásobní roztok pyrenu v acetonu o koncentraci $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Výsledná koncentrace pyrenu ve vzorku činila $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. V digestoři byl z vialek odpařen aceton.

Na závěr bylo z připraveného zahřátého systému odpipetováno 4 ml roztoku, který byl kvantitativně přenesen do vialek s předpřipraveným pyrenem. Příprava všech vzorků byla provedena 3krát.

Vialky byly zavíčkovány a ponechány protřepávat 48 hodin. Poté bylo provedeno měření na fluorescenčním spektrometru AMINCO-Bowman Series 2.

4.3.2 Pyren předsolubilizován v roztoku CTAB

V případě, kdy byl pyren předsolubilizován v roztoku CTAB bylo postupováno obdobně, pouze s několika odlišnostmi. Pyren nebyl připravován v jiné sadě vialek, nýbrž byl již předsolubilizován v zásobním roztoku CTAB. Výsledná koncentrace pyrenu v zásobním roztoku CTAB činila $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Další kroky přípravy byly provedeny stejně jako u přípravy 4.3.1. Zahřáté roztoky CTAB, hyaluronanu a prostředí byly smíchány, vialky byly následně zavíčovány a ponechány třepat 48 hodin.

4.3.3 Zmražení systémů

Všechny připravené vzorky byly po proměření uloženy do mrazáku v laboratoři. Tam byly skladovány při teplotě přibližně -18°C po dobu 24 hodin. Poté byly všechny vzorky rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 25°C . Vzorky byly vytemperovány na 25°C . Při této teplotě byly všechny vzorky opět proměřeny identickým způsobem jako v předchozím případě.

4.4 Měření a vyhodnocení dat

4.4.1 Fluorimetrie

Měření byla prováděna na luminiscenčním spektrometru AMINCO-Bowman Series 2. Stálá teplota měřených vzorků $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ byla zajištěna pomocí termostatu.

Jako fluorescenční sonda byl vybrán pyren. Byly měřeny fluorescenční emisní a excitační spektra. Emisní sken byl měřen v rozsahu vlnových délek od 360 do 530 nm, při rychlosti skenu $5 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$. Excitační sken v rozsahu od 310 do 340 nm, při stejné rychlosti skenu. Monochromátor emise byl nastaven na 392 nm a monochromátor excitace na 336 nm. Citlivost fotonásobiče byla nastavována automaticky.

V emisním spektru byla sledována intenzita prvního a třetího maxima při vlnových délkách 373 a 384 nm. Poměr těchto dvou maxim je pracovně označován jako emisní polaritní index EmPI. Tento poměr je obrazem polarity okolí pyrenu. Je používán pro zjištění lokalizace pyrenu v systému a pro zjištění hodnoty kritické micelární koncentrace.

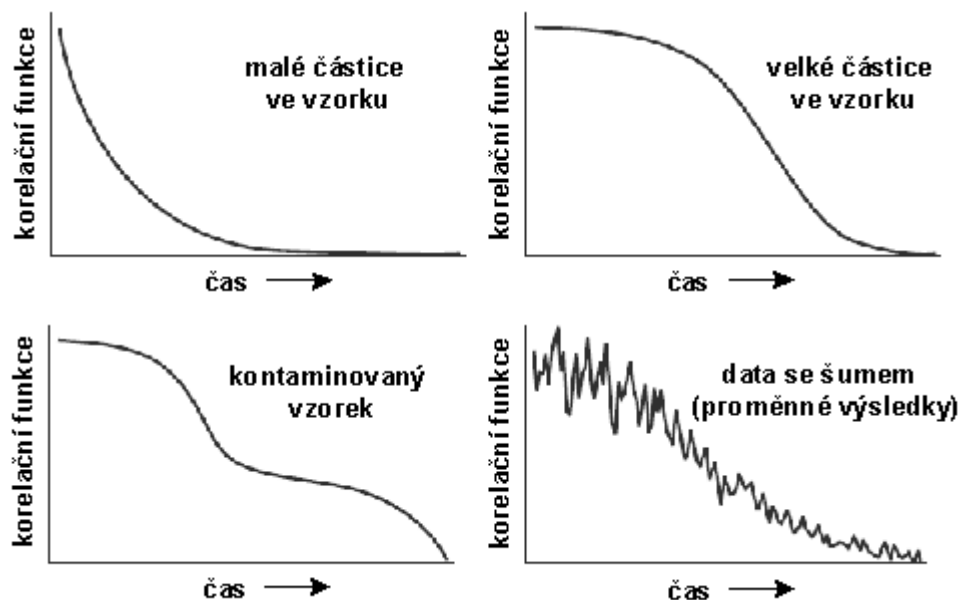
V emisním spektru byla také sledována hodnota intenzity fluorescence při 470 nm. Při této vlnové délce se vyskytuje emisní maximum excimeru pyrenu. Poměr intenzity fluorescence maxima excimeru (I_E) a intenzity fluorescence prvního maxima monomeru (I_M) je ukazatelem pravděpodobnosti tvorby excimeru v systému a užívá se také jako viskozitní parametr díky faktu, že tvorba excimeru je difúzně kontrolovaná.

V excitačním spektru byla sledována intenzita fluorescence při 333 a 338 nm. Poměr těchto intenzit je pracovně označován jako excitační polaritní index ExPI a je také ukazatelem polarity v okolí pyrenu.

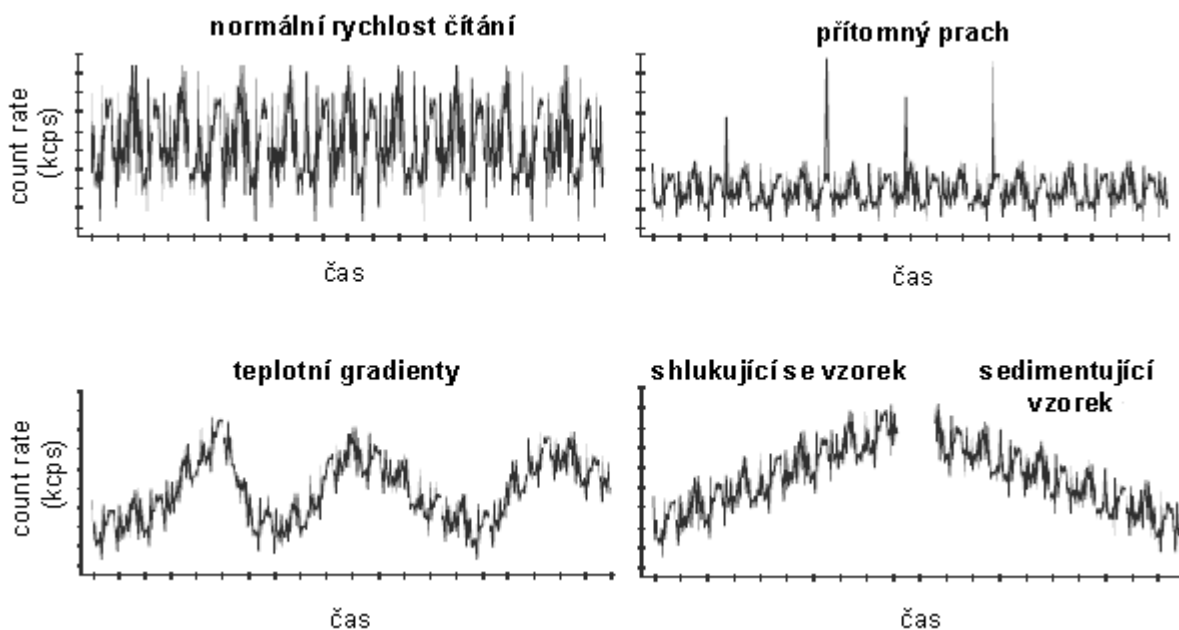
4.4.2 Dynamický rozptyl světla

Vzorky, jejichž prostředí tvořila voda, byly proměřeny metodou dynamického rozptylu světla. Měření byla prováděna na zařízení Zetasizer Nano od společnosti Malvern Instruments. U všech vzorků byla měřena distribuce velikosti částic v systému (režim *size*) a zeta-potenciál (režim *zeta*).

Při měření byl sledován především tvar korelační funkce (Obr. 15) a počet detekovaných fotonů za sekundu, tzv. *count rate* (rychlost čítání) (Obr. 16). Oba tyto parametry vypovídají o kvalitě vzorku. Následně byla vyobrazena intenzitní distribuce částic.



Obr. 15: Korelační funkce v závislosti na kvalitě vzorku [29]



Obr. 16: Vyobrazení count rate v závislosti na kvalitě vzorku [29]

V případě měření zeta-potenciálu byl sledován také tzv. phase plot (fázové vynesení), který vyjadřuje fázovou odezvu na vložené napětí na elektrodách měřící cely. Na počátku měření dochází k přepólování elektrod měřící cely velmi rychle, až 15krát za minutu, z čehož software určí elektroforetickou mobilitu a následně střední hodnotu zeta-potenciálu. Při dostatečně nízké vodivosti vzorku dojde následně k pomalému pulzu napětí, díky němuž dochází k vyladění a zpřesnění měření a určení distribuce zeta-potenciálu. V případě vysoké vodivosti vzorku k delšímu pulzu nedochází, protože by vložené napětí mohlo narušit vzorek a mohlo by dojít k zoxidování paladiových elektrod. V případě, je-li „phase plot“ vyobrazen v kladných hodnotách, znamená to, že částice v systému mají vnější kladný náboj. V opačném případě jsou agregáty v systému nabity záporně. S tvarem „phase plot“ souvisí také frekvenční posun vlny paprsku. Frekvence referenčního paprsku je 320 Hz. K fázovému posunu dochází při průchodu paprsku mezi elektrodami měřící cely ve vzorku. Posun fází k vyšším hodnotám značí kladný náboj částic ve vzorku, posun k hodnotám menším než 320 Hz značí záporný náboj částic.

Měření *size* i *zeta* bylo provedeno ve složené kapilární cele. Temperování vzorků na 25 °C bylo provedeno automaticky po nastavení softwaru. Opět bylo provedeno měření vzorků před zmražením i po rozmražení.

4.4.3 Statistika

Všechna fluorescenční měření byla prováděna minimálně třikrát. Presentované výsledky poměrů EmPI, ExPI a $I_E:I_M$ jsou průměrem ze všech měření provedených na daných vzorcích. K jednotlivým hodnotám byla stanovena směrodatná odchylka pomocí programu MS Excel. Směrodatné odchylky v grafech znázorňují chybové úsečky.

Měření DLS byla provedena také minimálně třikrát. Presentované závislosti jsou průměrem těchto měření.

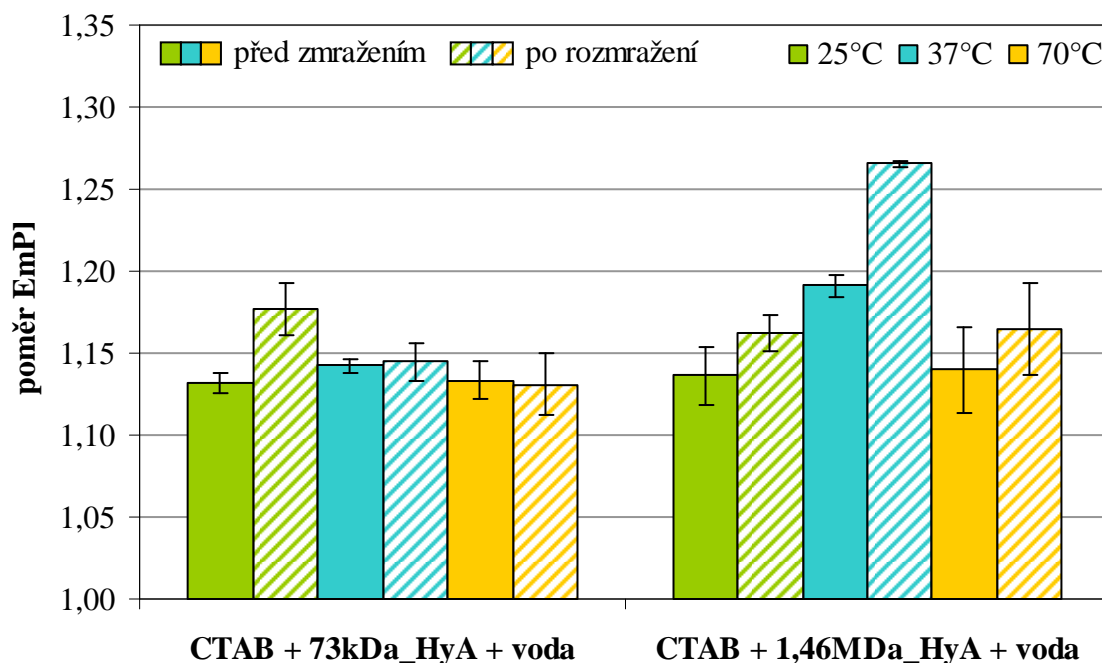
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Fluorimetrie

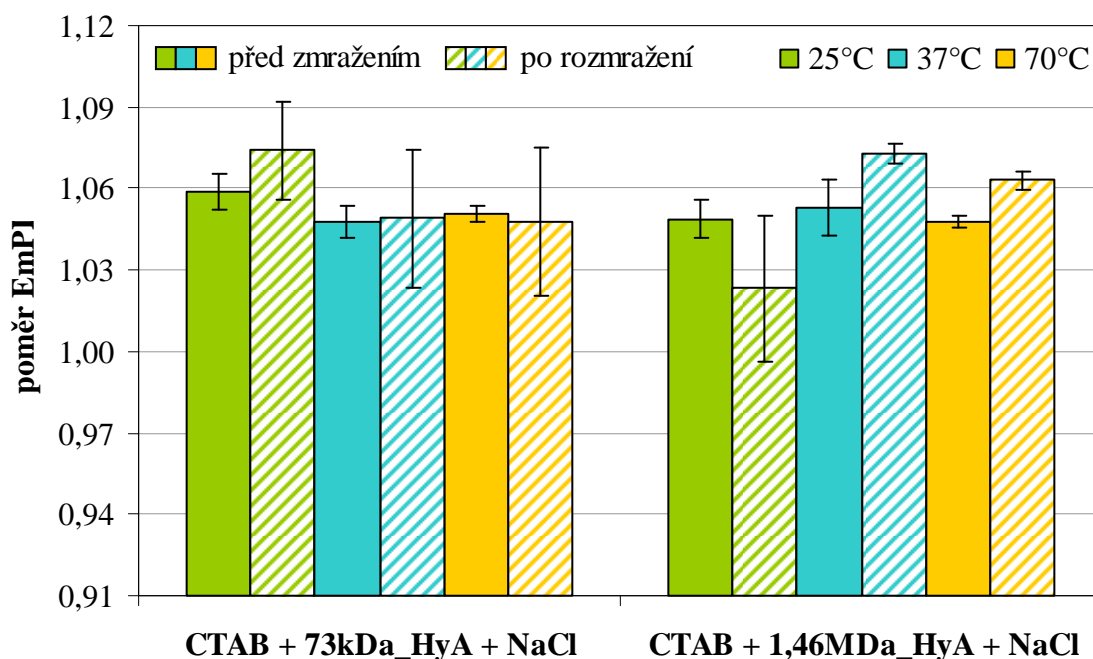
5.1.1 Zahřáté roztoky dávkovány do vialek s pyrenem

Sloupcové grafy na Obr. 17 a Obr. 18 znázorňují vliv teploty roztoků (tj. CTAB a hyaluronanu v prostředí vody nebo soli) při jejich směšování na polaritu výsledného systému, která je zastoupena polaritním poměrem EmPI. Tyto grafy vyobrazují případ, kdy byla fluorescenční sonda připravena v odlišné sadě vialek odpařením prostředí acetonu v digestoři s následným dávkováním již připraveného systému na sondu. Je zde také znázorněn vliv zmrazení systému na jeho následnou polaritu.

V grafu na Obr. 17 jsou znázorněny polaritní indexy systémů, jejichž prostředí bylo tvořeno vodou. Z grafu je patrné, že teplota při směšování roztoků má vliv na polaritu systémů a to zejména v případě vysokomolekulárního hyaluronanu. Porovnáním jednotlivých dvojic sloupců nelze sice vypožorovat žádný významný trend v závislosti na teplotě, ale je zřejmé, že teplota nějakým způsobem systému ovlivňuje. Polaritní index je ve většině vzorků mírně nižší před zmrazením, pouze v případě systému, který obsahoval vysokomolekulární hyaluronan při směšovací teplotě 37 °C, polaritní index vzorku po rozmražení výrazně převyšuje polaritní index vzorku před zmrazením. Dále si lze všimnout, že hodnoty polaritních indexů jsou v případě nízkomolekulárního hyaluronanu vyrovnanější než v případě vysokomolekulárního, což naznačuje, že systém obsahující vysokomolekulární hyaluronan je citlivější ke změnám v teplotě při přípravě systému.



Obr. 17: Porovnání vlivu teploty při přípravě systémů hyaluronan-tenzid v prostředí vody a vlivu zmrazení systému na polaritu systému získanou z emisního fluorescenčního skenu



Obr. 18: Porovnání vlivu teploty při přípravě systémů hyaluronan-tenzid v prostředí roztoku NaCl ($c = 0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a vlivu zmražení systému na polaritu systému získanou z emisního fluorescenčního skenu

V grafu na Obr. 18 jsou vyobrazeny polaritní indexy systémů v prostředí soli. Lze si všimnout mírného poklesu polarity (tzn. nižší hodnoty poměru EmPI) v porovnání se systémem, jehož prostředí tvořila voda (Obr. 17). Tato změna je způsobena rozdílnou hodnotou kritické micelární koncentrace CTAB ve vodě a v roztoku NaCl. Zatímco ve vodě se hodnota CMC pohybuje okolo $0,9 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, v roztoku NaCl jde o hodnotu o řád nižší. V prostředí vody se tedy s výslednou koncentrací CTAB $0,6 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ pohybujeme v oblasti blízké CMC. Micely se v roztoku teprve začínají tvořit. Pravděpodobně jsou v roztoku přítomny první micely, premicelární útvary a volné molekuly tenzidu. Poměr EmPI je charakteristický pro prostředí micel, u kterých ale dochází k difúzi polárního prostředí skrze stěnu micel, čímž se zvyšuje polarita jejich vnitřního prostředí. Na druhou stranu v prostředí roztoku NaCl se pohybujeme v oblasti vysoko nad CMC. V roztoku je přítomno mnoho micel, které poskytují hydrofobní prostor pro nepolární sondu. Pyren by tedy měl být plně solubilizován v micelách, čemuž odpovídají i hodnoty poměru EmPI.

Z grafu je dále zřejmé, že polaritní indexy jsou v rámci překryvu chybových úseček v případě nízkomolekulárního hyaluronanu vyrovnané před zmražením systému i po jeho rozmražení. U systémů, které obsahovaly vysokomolekulární hyaluronan je patrný o něco výraznější rozdíl polaritních indexů před zmražením systému a po jeho následném rozmražení. V případě směšovací teploty 25°C je po rozmražení systému polaritní index nižší, při 37°C a 70°C se polarita systému po rozmražení mírně zvýšila.

Po rozmražení všech vzorků byl pozorován jemný zákal těch vzorků, jejichž prostředí tvořila voda. Byla pozorována přítomnost malých sraženin ve vzorku. V roztoku zřejmě došlo vlivem zmražení k vytvoření větších agregátů. Tuto domněnku potvrzují i výsledky získané měřením dynamického rozptylu světla (viz kapitola 5.2). Zákal ovšem nebyl nijak výrazný

a ani při měření fluorescence se neprojevil zkreslením spekter. Vzorky, jejichž prostředí tvořil roztok NaCl, byly všechny zcela čiré. Tato odlišnost je pravděpodobně způsobena potlačením elektrostatických interakcí v systému v přítomnosti soli.

Grafy (Obr. 19, Obr. 20) znázorňují opět vliv teploty při přípravě systémů a vliv zmražení těchto systémů na jejich polaritu. Polarita systémů je zde vyobrazena pomocí polaritního indexu získaného z excitačního fluorescenčního spektra. Excitační spektrum je podle *Wilhelm a spol.* [55] dalším významným ukazatelem polarity v okolí sondy.

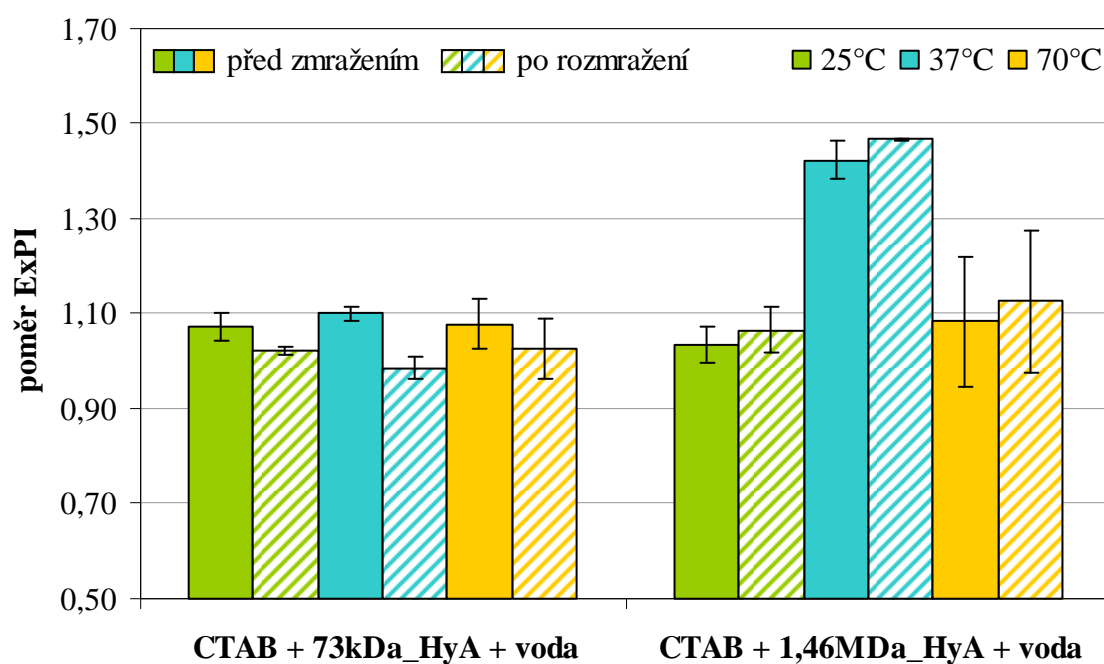
Systémy, jejichž prostředí tvoří voda (Obr. 19), většinou nevykazují žádný významný vliv teploty ani žádný vliv zmražení systému. U systémů obsahujících nízkomolekulární hyaluronan dochází vlivem zmražení systému k mírnému snížení polaritních indexů, zatímco v případě vysokomolekulárního hyaluronanu je tomu naopak. Vezmeme-li ovšem v úvahu překryv chybových úseček, hodnoty polaritních indexů ExPI se převážně shodují. Výjimku však tvoří systém, který obsahoval vysokomolekulární hyaluronan a byl připravován při teplotě roztoků 37 °C. Hodnoty ExPI jsou výrazně vyšší než ostatní, čímž se prohlubuje trend viditelný u polaritních poměrů EmPI (Obr. 17).

U systémů, jejichž prostředí tvořil roztok NaCl (Obr. 20), můžeme pozorovat nižší hodnoty poměrů ExPI, které jsou ukazatelem polarity blízkého okolí fluorescenční sondy v porovnání se systémem, jehož prostředí tvořila voda. Vysvětlení tohoto poklesu je uvedeno v komentáři grafů na Obr. 18 a Obr. 19. Právě změna prostředí má za následek tento pokles, neboť hodnoty kritických micelárních koncentrací jsou závislé na druhu prostředí.

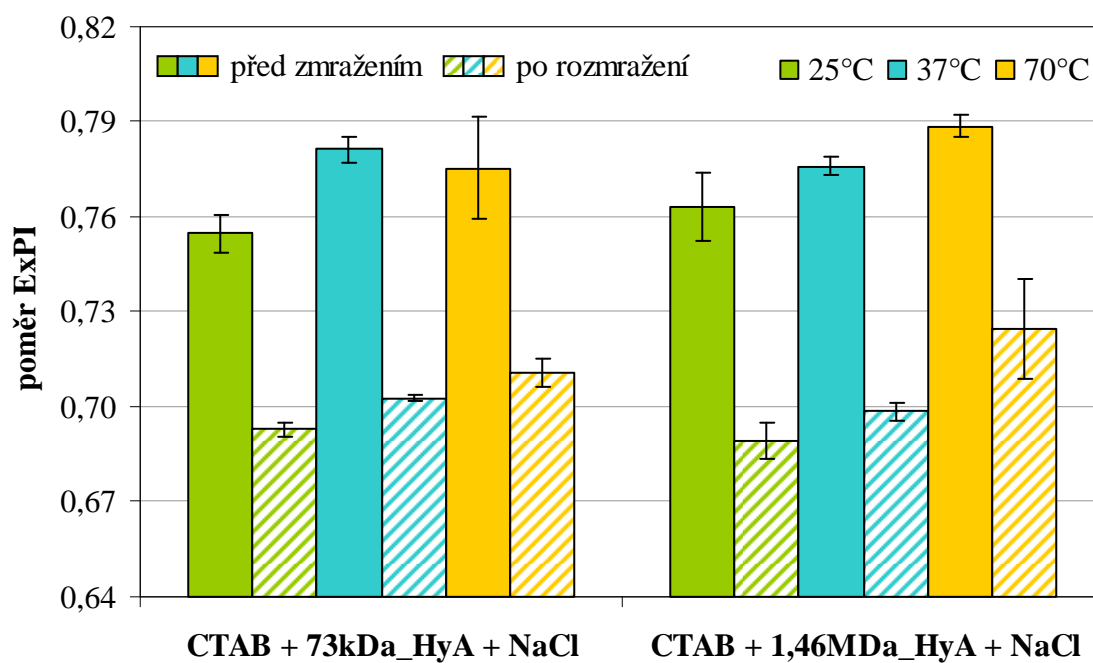
Dalším vysvětlením může být přítomnost takových agregátů, které jsou kompaktnější a nedovolují prodifundování vody skrze jejich stěnu. Právě prostředí soli, které má za následek odstínění repulzí mezi agregáty a také mezi polárními „hlavami“, které tvoří stěnu micely, je zodpovědné za nepropustnější stěnu micely. Všimneme-li si konkrétních hodnot polaritních poměrů ExPI (tabulka v Příloze 1) a srovnáme-li hodnoty pro prostředí vody a soli, zjistíme, že hodnoty poměrů pro vodu jsou většinou typické pro lokaci pyrenu v polárním prostředí a v prostředí micel, které svým tvarem dovolují polárnímu prostředí proniknout skrze jejich stěnu dovnitř, čímž se v jádru micely zvyšuje hodnota polarity. Hodnoty poměrů ExPI v prostředí soli jsou typické pro nepolární prostředí nepropustné micely.

Dále lze u těchto systémů pozorovat změny poměrů ExPI po rozmražení systémů. Hodnoty polaritních indexů ExPI jsou po rozmražení systému výrazně nižší, a to v případě nízkomolekulárního i vysokomolekulárního hyaluronanu. Tento pokles polarity je pravděpodobně způsoben následným vytvořením kompaktnějších a pevnějších micel. V grafu na Obr. 20 si lze dále všimnout, že polaritní indexy vyjadřující stav systému po jeho rozmražení mají rostoucí trend s rostoucí teplotou při přípravě systémů, a to převážně u systémů s vysokomolekulárním hyaluronanem.

V porovnání s polaritními poměry EmPI (Obr. 18) jsou rozdíly v polaritních poměrech ExPI po rozmražení systému výraznější, což by mohlo naznačovat, že polaritní poměry ExPI jsou k danému systému citlivější. Tato citlivost je ovšem dynamickým rozsahem indexu ExPI a může být ovlivněna nastavením přístroje a vlastní volbou vlnových délek, jejichž intenzity fluorescence tvoří daný polaritní index. Co se týče konkrétních hodnot polaritních indexů EmPI a ExPI, všechny hodnoty jsou charakteristické pro lokaci pyrenu v nepolárním prostředí micel.



Obr. 19: Porovnání vlivu teploty při přípravě systémů hyaluronan-tenzid v prostředí vody a vlivu zmražení systému na polaritu systému získanou z excitačního fluorescenčního skenu



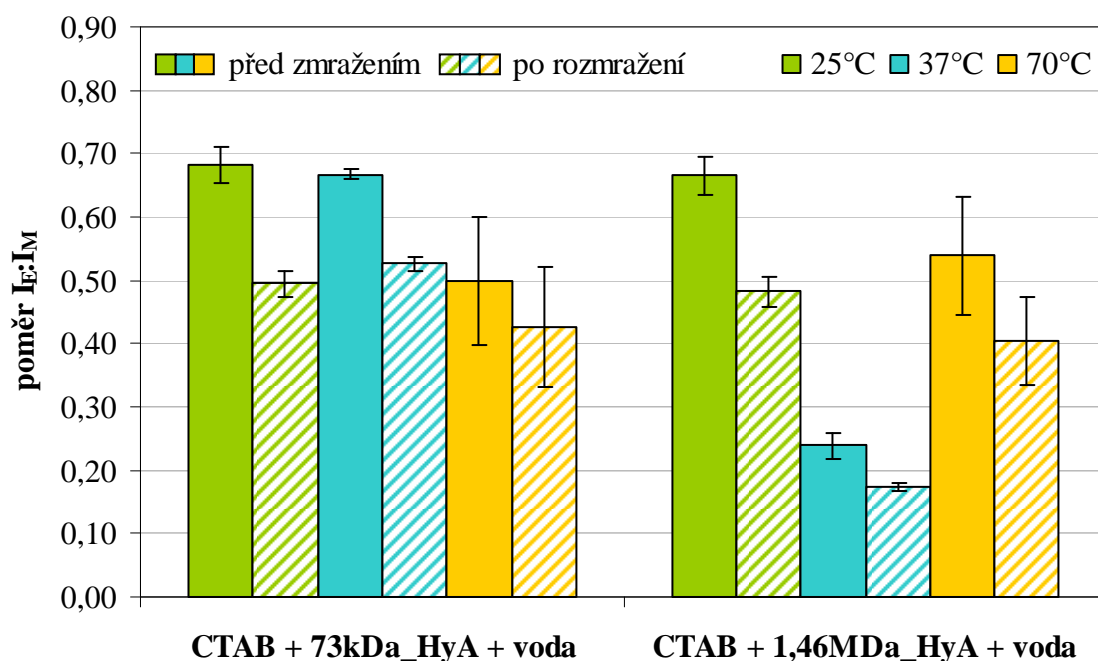
Obr. 20: Porovnání vlivu teploty při přípravě systémů hyaluronan-tenzid v prostředí roztoku NaCl ($c = 0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a vlivu zmražení systému na polaritu systému získanou z excitačního fluorescenčního skenu

V grafech (Obr. 21, Obr. 22) jsou znázorněny hodnoty poměru $I_E:I_M$, tj. hodnoty poměru excimeru a monomeru získané z emisního fluorescenčního spektra. Je zde znázorněno také porovnání systémů obsahujících nízkomolekulární a vysokomolekulární hyaluronan a porovnání systému před zmražením a po rozmražení.

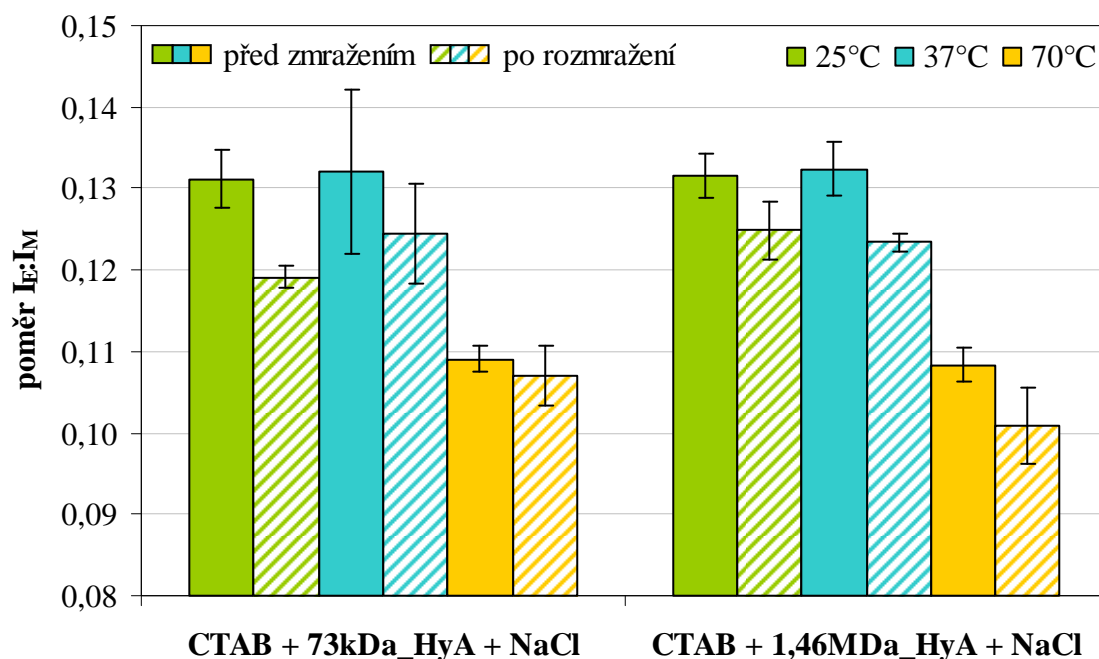
Z grafů je zřejmé, že hodnota viskozitního poměru $I_E:I_M$ klesá po rozmražení systému. Pokles signálu excimeru se dá vysvětlit vytvořením většího počtu agregátů, které převyšují koncentraci pyrenu v roztoku a pravděpodobnost tvorby excimeru se snižuje.

Snížení hodnoty $I_E:I_M$ v soli je nejpravděpodobněji způsobeno tím, že v roztoku soli se pohybujeme s koncentrací CTAB $0,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ v oblasti vysoko nad hodnotou CMC. V systému je tak velké množství micel, ve kterých jsou molekuly pyrenu rovnoměrně rozloženy, čímž výrazně klesá pravděpodobnost tvorby excimeru a s tím i jeho intenzita. V prostředí vody se s danou koncentrací tenzidu pohybujeme okolo CMC, v systému dochází k tvorbě prvních agregátů a pravděpodobnost tvorby excimeru je velice vysoká.

Dále je v grafu na Obr. 21 zřejmý výrazný pokles intenzity excimeru u systému, který obsahoval vysokomolekulární hyaluronan a byl připravován při teplotě 37°C , což souhlasí se změnami polaritních indexů vyobrazených v grafech na Obr. 17 a na Obr. 19. Lze tedy říci, že v analogických vzorcích klesá tvorba excimeru a roste polaritní index, což v podstatě potvrzuje výsledky navzájem. Ve vzorcích dochází pravděpodobně k tvorbě většího počtu micel s kompaktnějším polárnějším jádrem.



Obr. 21: Porovnání vlivu teploty při přípravě systémů hyaluronan-tenzid v prostředí vody a vlivu zmražení systému na poměr intenzity excimeru a monomeru

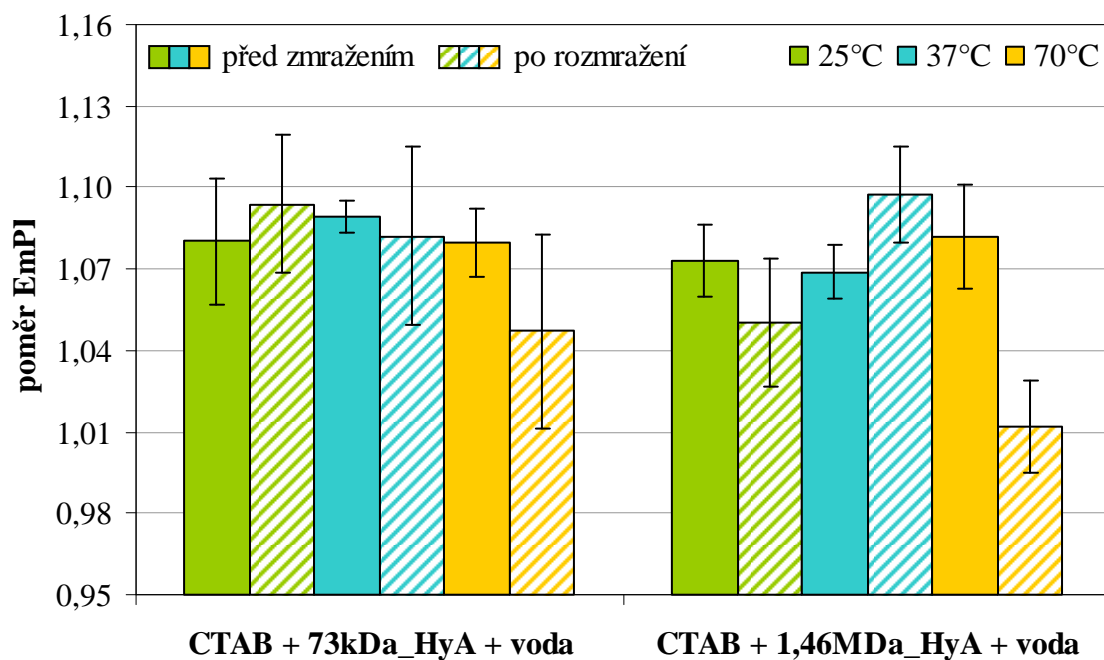


Obr. 22: Porovnání vlivu teploty při přípravě systémů hyaluronan-tenzid v prostředí roztoku NaCl ($c = 0,15 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a vlivu zmražení systému na poměr intenzity excimeru a monomeru

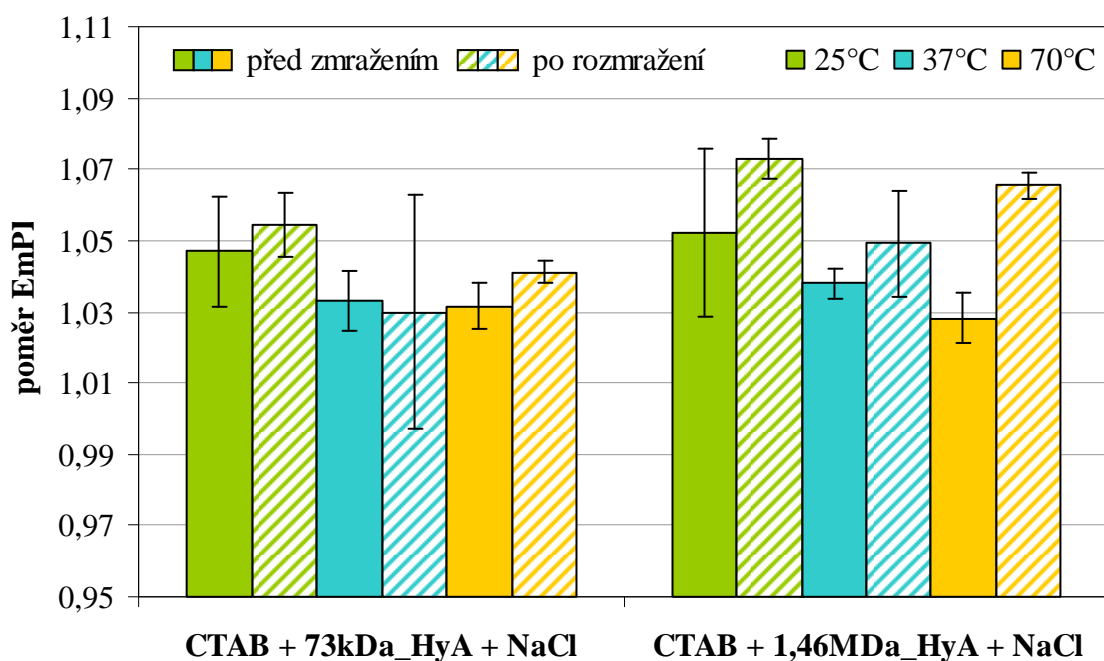
V grafu na Obr. 22 si lze všimnout výraznějšího poklesu intenzity excimeru u systémů, které byly připravovány při teplotě 70 °C. Tento pokles ovšem není nijak potvrzen hodnotami polaritních indexů, které nevykazují žádný významný růst. V těchto systémech tedy zřejmě došlo k tvorbě většího počtu micel než při nižších teplotách. Kompaktnost těchto micel zůstala na stejné úrovni jako při nižších hodnotách teploty. Intenzita excimeru je u obou molekulárních hmotností hyaluronanu při teplotách 25 °C a 37 °C vyrovnaná.

Dále si lze v grafu na Obr. 22 všimnout poklesu poměru $I_E:I_M$ po rozmražení systému, což je pravděpodobně důsledkem vytvoření většího počtu micel, které svým prostorem převyšují koncentraci fluorescenční sondy a pravděpodobnost tvorby excimeru se tudíž snižuje.

5.1.2 Pyren předsolubilizován v zásobním roztoku CTAB



Obr. 23: Porovnání vlivu teploty při přípravě systémů hyaluronan-tenzid v prostředí vody a vlivu zmražení systému na polaritu systému získanou z emisního fluorescenčního skenu



Obr. 24: Porovnání vlivu teploty při přípravě systémů hyaluronan-tenzid v prostředí soli ($c = 0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a vlivu zmražení systému na polaritu systému získanou z emisního fluorescenčního skenu

Grafy na Obr. 23 a Obr. 24 znázorňují ty systémy, ve kterých nebyl pyren odpařován v odlišné sadě vialek, nýbrž byl již předsolubilizován v zásobním roztoku CTAB. Z grafů není patrný téměř žádný významný vliv teploty roztoků při jejich směšování, chybové úsečky jednotlivých sloupců pro systémy před zmražením i po jeho rozmražení se ve většině případů překrývají.

Polaritní indexy na Obr. 23 mají mírně nižší hodnoty než polaritní indexy znázorněné na Obr. 17, což znamená, že systémy připravené způsobem předsolubilizování sondy v roztoku tenzidu jsou méně polární než systémy, kde při přípravě docházelo k postupnému smíchání sondy a směsi tenzidu a hyaluronanu. Snížení polaritnosti je pravděpodobně způsobeno tím, že se v systému tvoří kompaktnější micely, které tolik nedovolují prodifundování vody skrze stěnu micely a jsou tedy méně polární.

V grafech na Obr. 24 jsou hodnoty polaritních indexů jen nepatrně nižší než hodnoty v grafu na Obr. 18, přičemž tyto dva grafy opět vyjadřují výsledky pro různé přípravy daných systémů. Konkrétní hodnoty polaritních indexů jsou charakteristické pro solubilizaci pyrenu v hydrofobním prostředí kompaktní micely.

Porovnáním polaritních indexů EmPI z prostředí vody (Obr. 23) a z prostředí soli (Obr. 24) zjišťujeme, že hodnoty jsou srovnatelné a jsou typické pro případ, kdy je pyren zcela solubilizován v micelách. Tento trend je odlišný od polaritních indexů systémů, u nichž bylo zavedení sondy do systému provedeno jiným způsobem (příprava 4.3.1). Při přípravě, kdy byla sonda dávkována do vialek a následně byla zalita smíchaným systémem tenzid-hyaluronan, mělo prostředí systémů výraznější vliv na polaritu, což bylo způsobeno především rozdílnou hodnotou CMC v prostředí vody a soli.

V prostředí vody, při předsolubilizování sondy v zásobním roztoku tenzidu, je vytvořeno mnoho micel, protože koncentrace zásobního roztoku byla desetkrát vyšší než výsledná koncentrace vzorku. Fluorescenční sonda se tedy mohla volně rozprostřít po přítomných micelách. V zásobním roztoku byly přítomny micely obsahující sondu i micely bez sondy. Při následném odebrání příslušného množství tenzidu s pyrenem mohlo dojít k odebrání převážně těch „prázdných“ micel. Koncentrace sondy ve výsledném roztoku byla nižší než v předchozím způsobu přípravy. V těchto systémech, kde se při dané koncentraci okolo CMC vytvářejí první premicelární agregáty a micely, jsou přítomné molekuly sondy solubilizovány v prvních micelách. Na druhou stranu může také vlivem odlišného způsobu přípravy docházet k tvorbě kompaktnějších micel, jejichž stěna je méně proniknutelná pro okolní polární prostředí.

Jak již bylo zmíněno, v prostředí soli jsou hodnoty polaritních indexů srovnatelné pro oba způsoby přípravy, což je zřejmě způsobeno opět hodnotou CMC, ale také stíněním repulzí na polárních hlavách micel, které jsou tím kompaktnější a nepropustnější pro polární prostředí.

Následující grafy (Obr. 25, Obr. 26) znázorňují vliv teploty při přípravě systémů a vliv zmražení těchto systémů na hodnoty polaritních indexů ExPI.

Na obou grafech je zřejmý vliv zmražení systému na jeho následnou polaritu. Polaritou je pro připomenutí myšlena polarita blízkého okolí pyrenu, což nám vypovídá o lokaci pyrenu v systému. Zmražení systému tedy způsobilo vytvoření kompaktnějších agregátů, jejichž vnitřní prostředí se stalo nepřístupné molekulám rozpouštědla.

Pokud porovnáme konkrétní hodnoty poměrů ExPI (Příloha 1), vidíme, že v prostředí vody byly hodnoty před zmražením typické pro lokaci pyrenu v částečně propustných micelách,

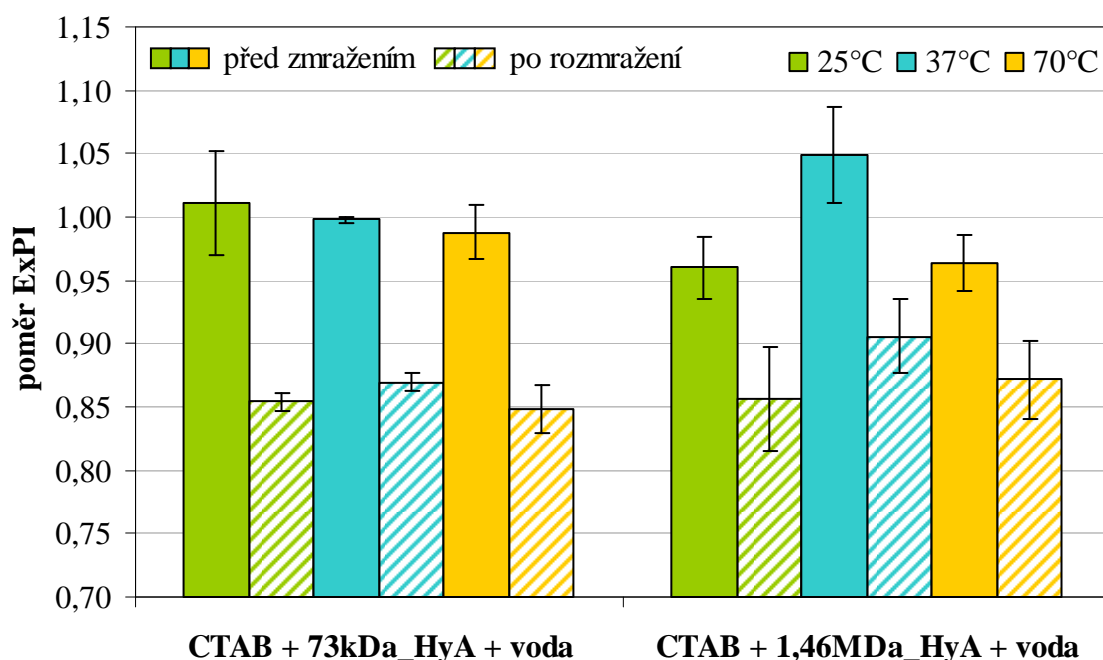
zatímco po zmražení a následném rozmražení systému jsou hodnoty typické pro lokaci pyrenu v téměř plně hydrofobním prostředí.

Hodnoty poměrů ExPI pro prostředí soli jsou charakteristické pro hydrofobní prostředí v obou případech (před zmražením i po rozmražení systému). Pokles hodnot opět naznačuje tvorbu kompaktnějších micel.

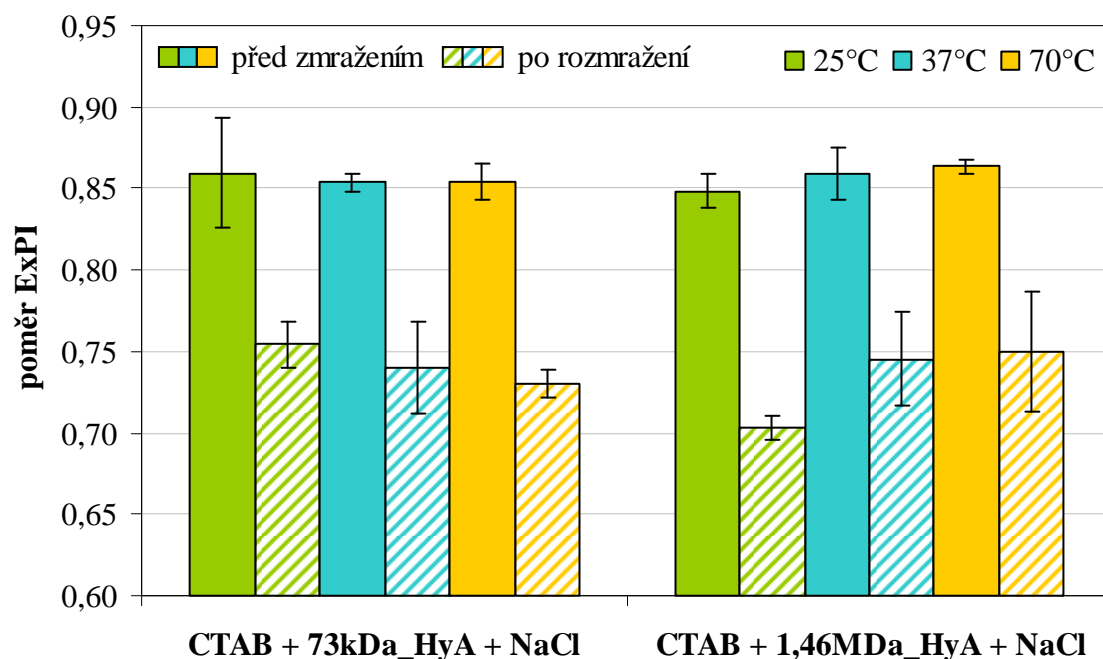
Porovnáním polaritních indexů EmPI (Obr. 23 a Obr. 24) a ExPI (Obr. 25 a Obr. 26) je zřejmé, že výsledné polaritní indexy získané z excitačního spektra jsou citlivější k polaritním změnám v daných systémech. Jak již bylo zmíněno, myšlená citlivost je ovlivněna aktuálním nastavením přístroje. Zatímco u polaritních indexů EmPI jsou hodnoty v rámci překryvu chybových úseček převážně vyrovnané před i po zmražení systému, změny polaritních poměrů ExPI jsou vlivem zmražení systému zřetelně sníženy.

Porovnáme-li konkrétní hodnoty polaritních indexů ExPI pro různé způsoby přípravy systému, zjistíme, že v prostředí vody (Obr. 19 a Obr. 25) došlo k mírnému poklesu u systémů, jejichž příprava zahrnovala předsolubilizování fluorescenční sondy v zásobním roztoku tenzidu, zatímco v prostředí soli (Obr. 20 a Obr. 26) je tomu naopak. V prostředí vody došlo ke snížení polaritních indexů, což je zřejmě způsobeno tvorbou kompaktnějších micel v systému a dále došlo k výraznější změně polaritní vlivem zmražení systému.

Polaritní indexy ExPI systémů, jejichž prostředí tvořil roztok soli, a u nichž byl při přípravě použit zásobní roztok tenzidu s předsolubilizovanou sondou (Obr. 26), mají srovnatelné hodnoty ve stavu po rozmražení systému s hodnotami ve stavu před zmražením systémů, které byly připraveny dávkováním zahřáté směsi roztoků tenzidu a hylauranu na pyren. Při druhém zmíněném způsobu přípravy se tedy v systému vytváří kompaktnější micely s nepropustnou stěnou a plně hydrofobním jádrem.



Obr. 25: Porovnání vlivu teploty při přípravě systémů hyaluronan-tenzid v prostředí vody a vlivu zmražení systému na polaritu systému získanou z excitačního fluorescenčního skenu



Obr. 26: Porovnání vlivu teploty při přípravě systémů hyaluronan-tenzid v prostředí soli ($c = 0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a vlivu zmražení systému na polaritu systému získanou z excitačního fluorescenčního skenu

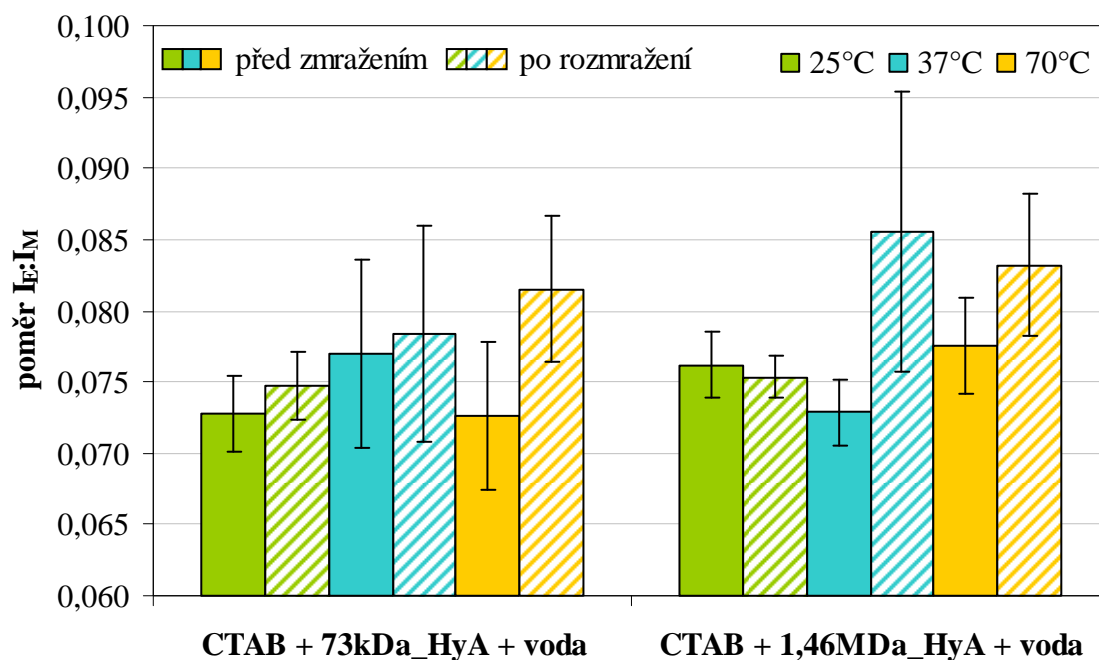
V grafech (Obr. 27, Obr. 28) jsou znázorněny hodnoty poměru $I_E:I_M$, které byly získány z emisního fluorescenčního spektra.

V převážné většině případů hodnoty poměrů $I_E:I_M$ po rozmražení systémů mírně vzrostly. Avšak tento trend znehodnocuje překryv chybových úseček. Vzdělání poměrů se dá vysvětlit vytvořením větších agregátů, které dovolují solubilizaci více molekul pyrenu v jedné micelle. Vyšší hodnota poměrů znamená vyšší pravděpodobnost srážky dvou molekul pyrenu, s čímž přímo souvisí vyšší intenzita fluorescence excimerového pásu.

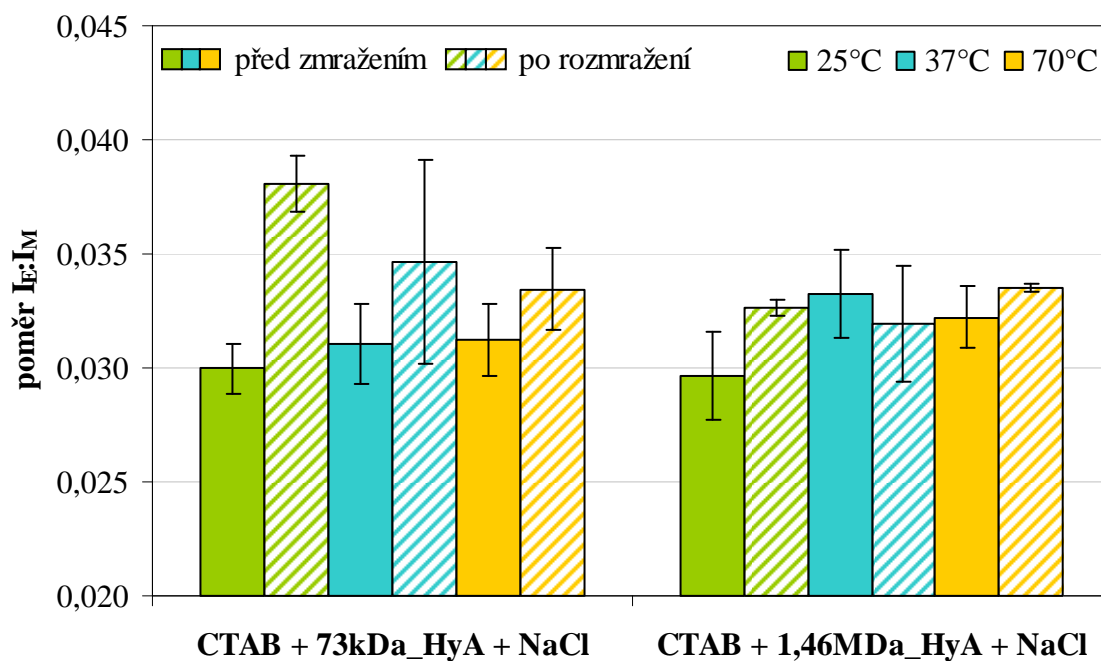
Porovnáním konkrétních hodnot poměrů $I_E:I_M$ pro oba způsoby přípravy systémů zjišťujeme, že hodnoty pro systémy, u nichž byl při přípravě pyrenu předsolubilizován v zásobním roztoku tenzidu CTAB, jsou výrazně nižší (až desetkrát) než hodnoty poměrů těchto systémů, ve kterých byl pyren dávkován do všech vialek (viz příprava 4.3.1). Opět je zde také patrný rozdíl v hodnotách pro systémy s různým prostředím. Systémy, jejichž prostředí tvoří roztok NaCl, mají opět výrazně nižší hodnoty poměrů $I_E:I_M$.

Výrazně nižší hodnoty poměrů $I_E:I_M$ ve srovnání s předchozím způsobem přípravy tkví v samotné metodě. Při přípravě systémů byl použit zásobní roztok tenzidu s již předsolubilizovanou sondou. To znamená, že při koncentraci zásobního roztoku CTAB $6 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, se pohybujeme vysoko nad hodnotou CMC. To má za následek velké množství micel v roztoku. Daná koncentrace pyrenu tedy nezaplní všechny hydrofobní prostory, které poskytují micely v roztoku. Proto bude pyren v zásobním roztoku mezi micelami volně rozložen a pravděpodobnost tvorby excimeru bude velmi malá. Ze zásobního roztoku bylo do výsledných systémů pipetováno určité množství tenzidu, ve kterém byly obsaženy micely obsahující pyren i micely bez pyrenu. Koncentrace pyrenu ve výsledném systému je nižší než u systémů připravených postupem diskutovaným v kapitole 5.1.1.

Vliv prostředí soli na poměr $I_E:I_M$ byl vysvětlen již v předchozí kapitole. V úvahu lze při vysvětlování brát stínění repulzí mezi náboji na agregátech a také použitou koncentraci tenzidu a jeho hodnotu CMC (viz kapitola 5.1.1, Obr. 21 a Obr. 22).



Obr. 27: Porovnání vlivu teploty při přípravě systémů hyaluronan-tenzid v prostředí vody a vlivu zmrazení systému na poměr intenzity excimeru a monomeru



Obr. 28: Porovnání vlivu teploty při přípravě systémů hyaluronan-tenzid v prostředí soli ($c = 0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a vlivu zmrazení systému na poměr intenzity excimeru a monomeru

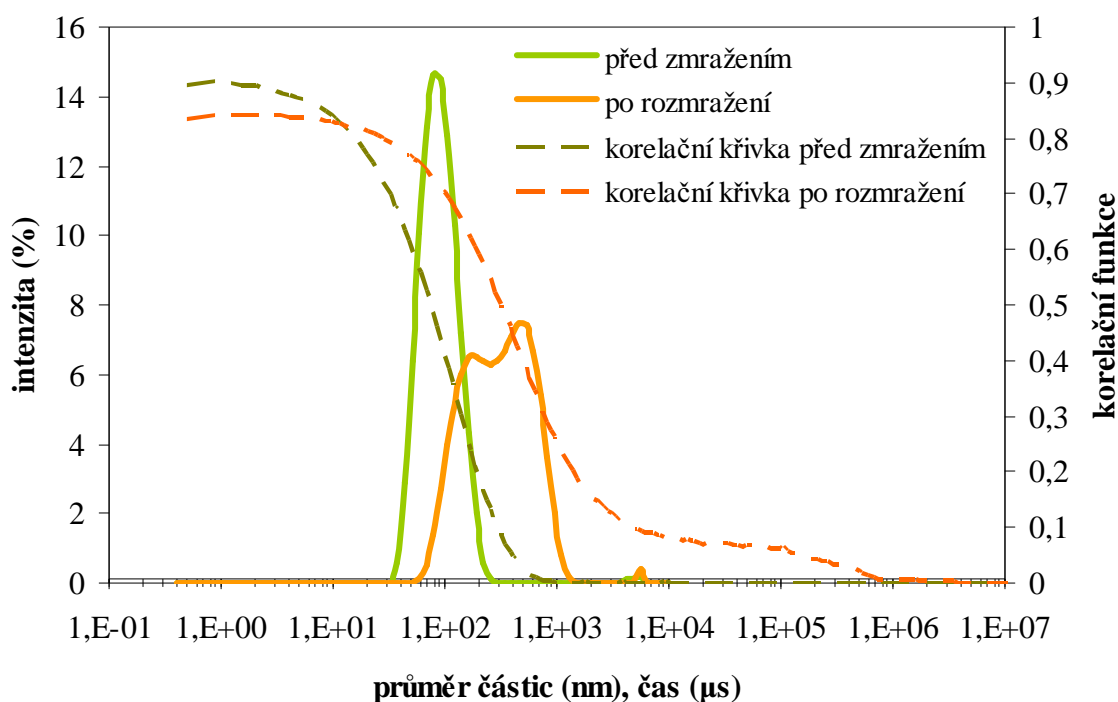
5.2 Dynamický rozptyl světla

5.2.1 Režim SIZE, hyaluronan ($M_w = 73$ kDa) + CTAB v prostředí vody

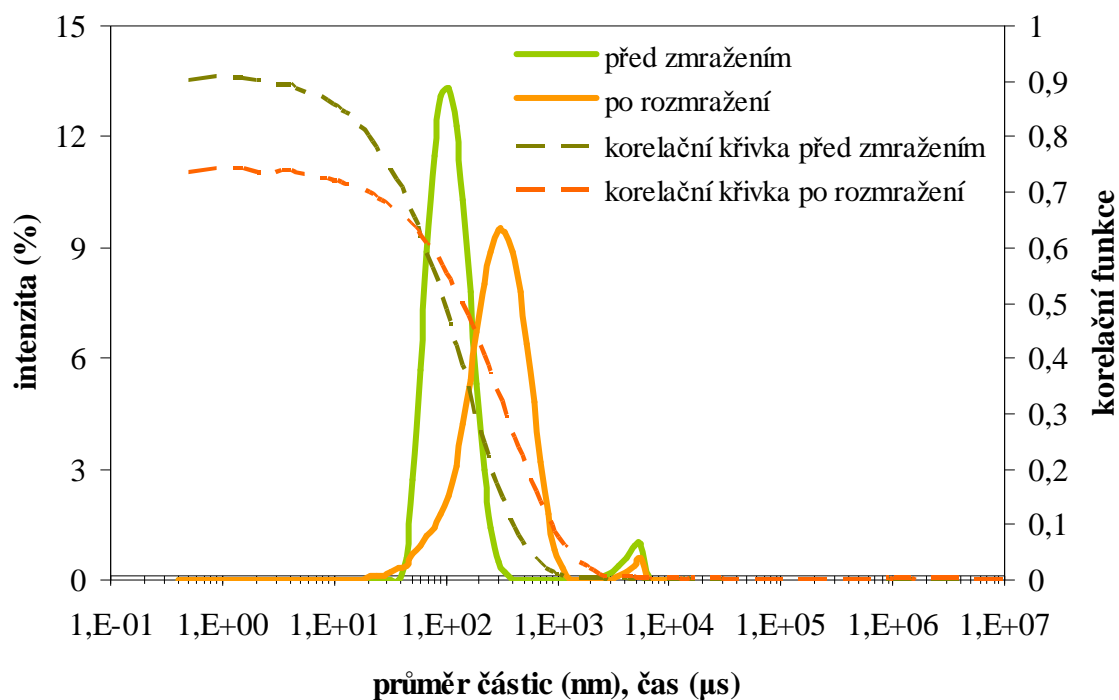
Obr. 29, Obr. 30 a Obr. 31 znázorňují intenzitní distribuce velikosti částic v systému, který obsahuje CTAB a nízkomolekulární hyaluronan v prostředí vody. Jednotlivé grafy se liší teplotou, při které bylo při přípravě systémů provedeno smíchání jednotlivých složek. Jsou vyobrazeny dvě křivky, a to distribuce částic před zmražením systému a distribuce částic po rozmražení po 24 hodinách. V grafech jsou dále znázorněny korelační křivky pro jednotlivé intenzitní distribuce částic. Korelační křivky jsou kvalitativním ukazatelem distribucí.

Při porovnání těchto grafů je zřejmé, že teplota zásobních roztoků při jejich směšování při přípravě má vliv na distribuci velikosti částic v systému. Distribuce velikosti částic se s rostoucí teplotou zvětšuje, rozšiřuje se směrem k vyšším hodnotám průměrů částic. Systém se tedy s rostoucí teplotou stává více polydisperzní. Největší zastoupení mají částice s průměrem 90–120 nm. V grafech je také patrné malé zastoupení částic s velikostí pohybující se okolo 5500 nm. Distribuce těchto částic se s rostoucí teplotou mírně zvětšuje.

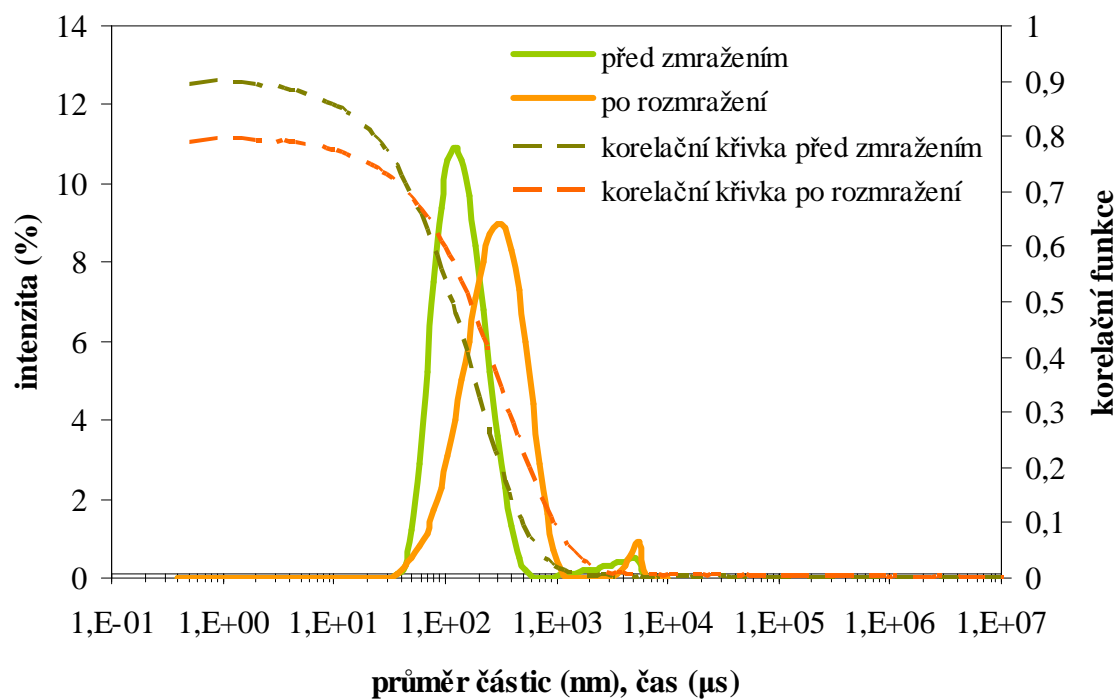
Z grafů je také na první pohled zřejmé, že v systému jsou po rozmražení zastoupeny částice o větším průměru, přičemž jejich distribuce je širší. Zmražení systému má tedy za následek růst polydisperzity agregátů. Velikost částic se pohybuje v rozmezí od 40 po 1300 nm.



Obr. 29: Distribuce velikosti částic podle intenzity rozptýleného světla systému nízkomolekulární hyaluronan-tenzid v prostředí vody pro směšovací teplotu 25 °C



Obr. 30: Distribuce velikosti částic podle intenzity rozptýleného světla systému nízkomolekulární hyaluronan-tenzid v prostředí vody pro směšovací teplotu 37 °C



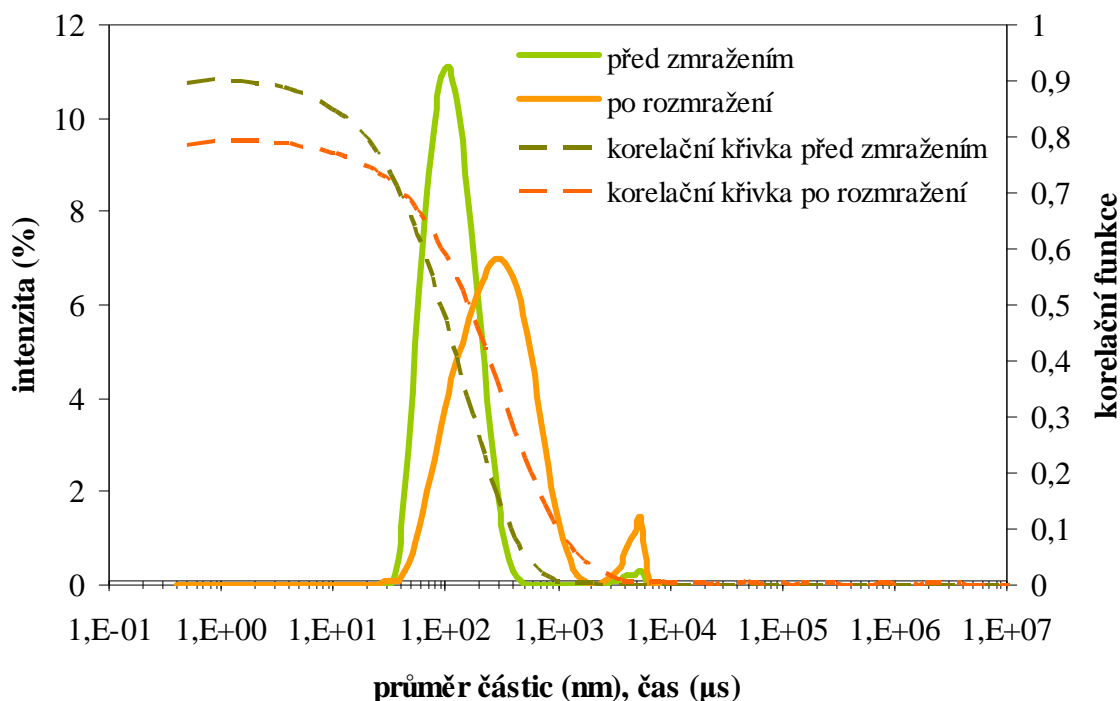
Obr. 31: Distribuce velikosti částic podle intenzity rozptýleného světla systému nízkomolekulární hyaluronan-tenzid v prostředí vody pro směšovací teplotu 70 °C

5.2.2 Režim SIZE, hyaluronan ($M_w = 1,46$ MDa) + CTAB v prostředí vody

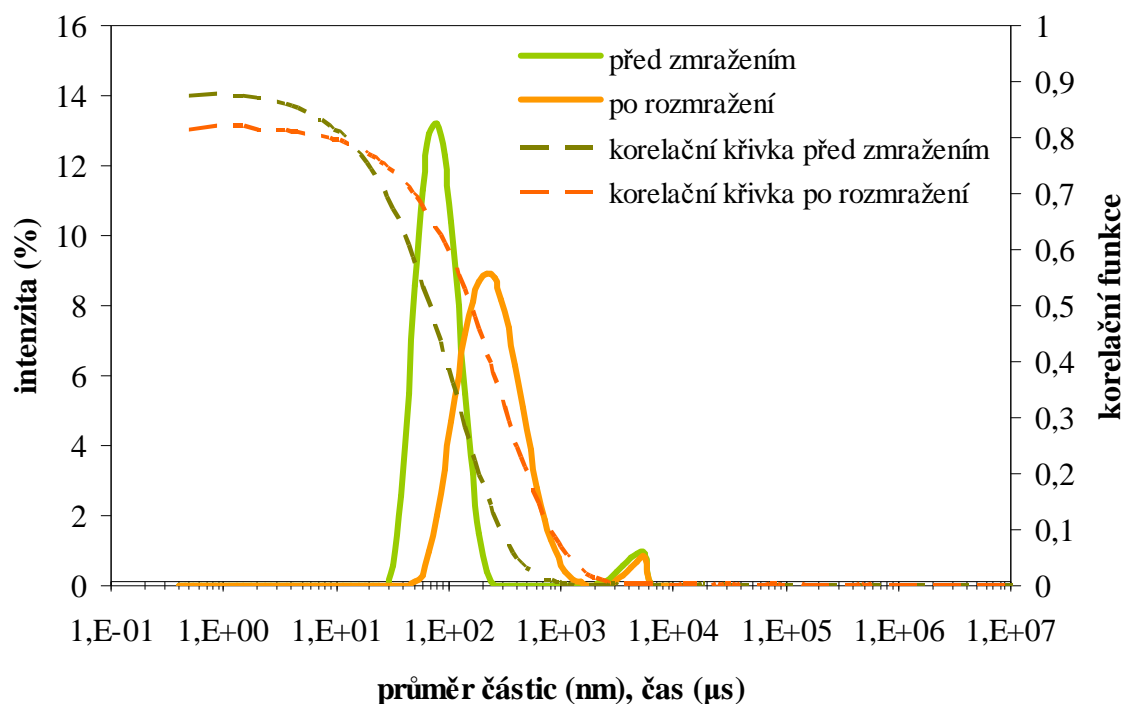
V grafech na Obr. 32, 33 a 34 jsou znázorněny intenzitní distribuce velikosti částic v systému, který obsahuje CTAB a vysokomolekulární hyaluronan v prostředí vody. Jednotlivé grafy se opět liší teplotou při směšování složek při přípravě. Opět jsou vyobrazeny distribuce částic před zmražením systému a po jeho rozmražení a příslušné korelační křivky.

Srovnáním jednotlivých distribucí při různých teplotách je zřejmé, že teplota zásobních roztoků při přípravě systému má zřejmě jen mírný vliv na velikosti částic v systému a na agregační vlastnosti jednotlivých složek. Velikost většiny částic před zmražením systému se pohybuje v rozmezí průměrů od 40 nm do 220 nm, přičemž je opět zřejmá přítomnost agregátů s poloměry až kolem 5500 nm. Bližším zkoumáním jednotlivých distribucí si lze všimnout, že s rostoucí teplotou se distribuce částic posunuje k větším polůměrům agregátů. Také dochází s rostoucí teplotou k zúžení distribucí velikostí agregátů v systému. Lze tedy říci, že s rostoucí teplotou roztoků při jejich směšování se v systému tvoří částice s velmi podobnými velikostmi, snižuje se polydisperzita systému. V případě nízkomolekulárního hyaluronanu tomu bylo naopak, polydisperzita systému se s rostoucí teplotou zvyšovala.

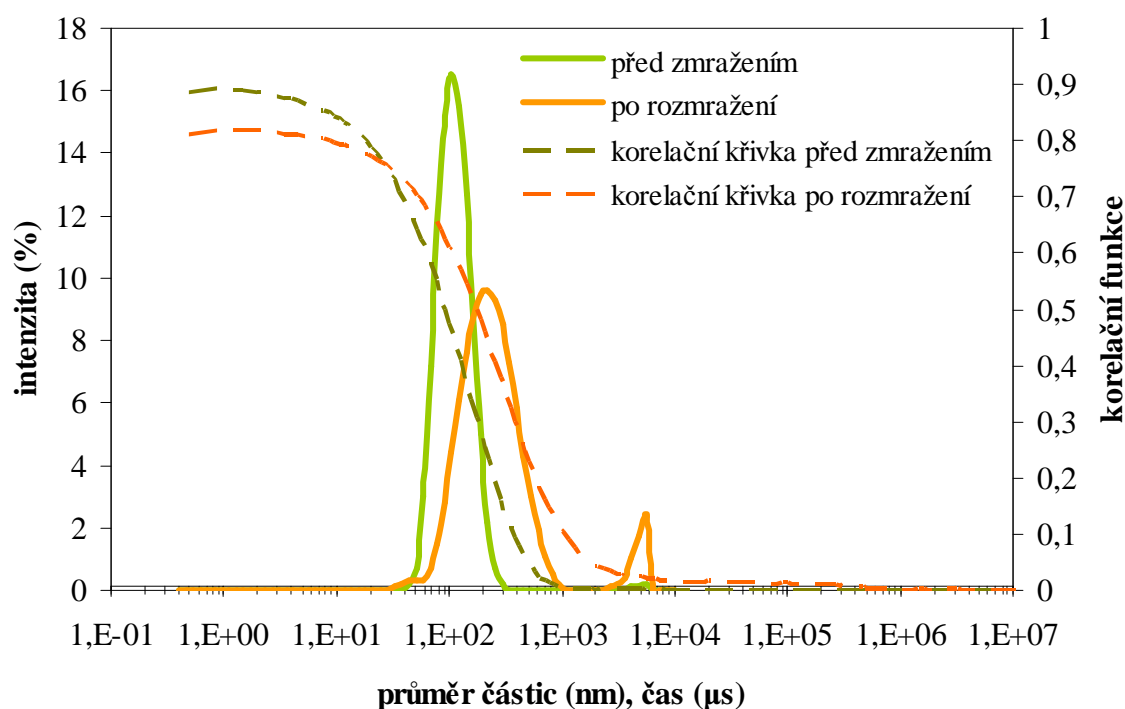
Z grafů je také patrné, že zmražení systému způsobuje následnou tvorbu větších částic. Distribuce velikostí částic je širší než před zmražením systému, systém je tedy více polydisperzní. Polydisperzita systému se však s rostoucí teplotou zmenšuje stejně jako před zmražením systému. Tento trend zůstává zachován. Průměry agregátů se pohybují v rozmezí 40–1800 nm pro teplotu 25 °C. S rostoucí teplotou se horní hranice rozmezí snižuje až na 1000 nm. V grafech je také vidět, že zmražení systému způsobuje zvýšení počtu částic, jejichž velikost se pohybuje až okolo 5500 nm.



Obr. 32: Distribuce velikosti částic podle intenzity rozptýleného světla systému vysokomolekulární hyaluronan-tenzid v prostředí vody pro směšovací teplotu 25 °C



Obr. 33: Distribuce velikosti částic podle intenzity rozptýleného světla systému vysokomolekulární hyaluronan-tenzid v prostředí vody pro směšovací teplotu 37 °C



Obr. 34: Distribuce velikosti částic podle intenzity rozptýleného světla systému vysokomolekulární hyaluronan-tenzid v prostředí vody pro směšovací teplotu 70 °C

Zkoumané systémy se lišily pouze v molekulové hmotnosti hyaluronanu. Lze říci, že molekulová hmotnost hyaluronanu nemá žádný významný vliv na velikost částic v systému. Průměry jednotlivých agregátů jsou v obou případech obdobné. Pouze se zdá, že při použití nízkomolekulárního hyaluronanu se s rostoucí teplotou distribuce částic zvětšuje, systém je s rostoucí teplotou polydisperznější, zatímco v případě použití vysokomolekulárního hyaluronanu je tento trend opačný. Rozdíly ve velikosti částic se ovšem pohybují přibližně okolo stejných hodnot, takže tento trend není nijak jednoznačný ani významný.

Tabulka č. 1: Rozmezí velikostí částic v systému hyaluronan-CTAB v prostředí vody

M_w HyA	teplota při přípravě (°C)	rozsah poloměrů částic (nm)			
		před zmražením		po rozmražení	
73 kDa	25	40–260	4600–5600	60–1280	4800–6400
	37	40–400	3000–6400	40–1280	4000–6400
	70	40–600	1800–6400	40–1280	3600–6400
1,46 MDa	25	40–460	4000–6400	40–1720	3000–6400
	37	30–200	2600–6400	60–1480	3000–6400
	70	40–300	5600–6400	40–1000	3000–6400

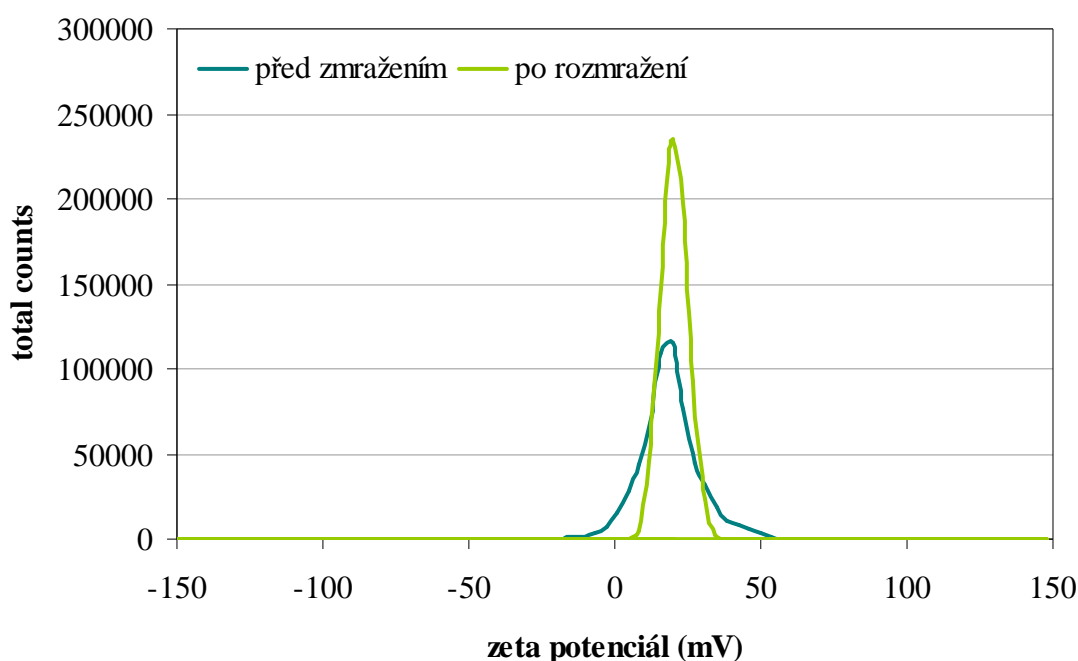
5.2.3 Režim ZETA, hyaluronan ($M_w = 73$ kDa) + CTAB v prostředí vody

V následujících grafech (Obr. 35, Obr. 36 a Obr. 37) jsou vyobrazeny distribuční křivky zeta-potenciálu systému obsahujícího CTAB a nízkomolekulární hyaluronan v prostředí vody. Vyobrazené hodnoty tzv. total counts představují celkový počet detekovaných fotonů. V grafech je také znázorněn stav systému před zmražením a po jeho následném rozmražení.

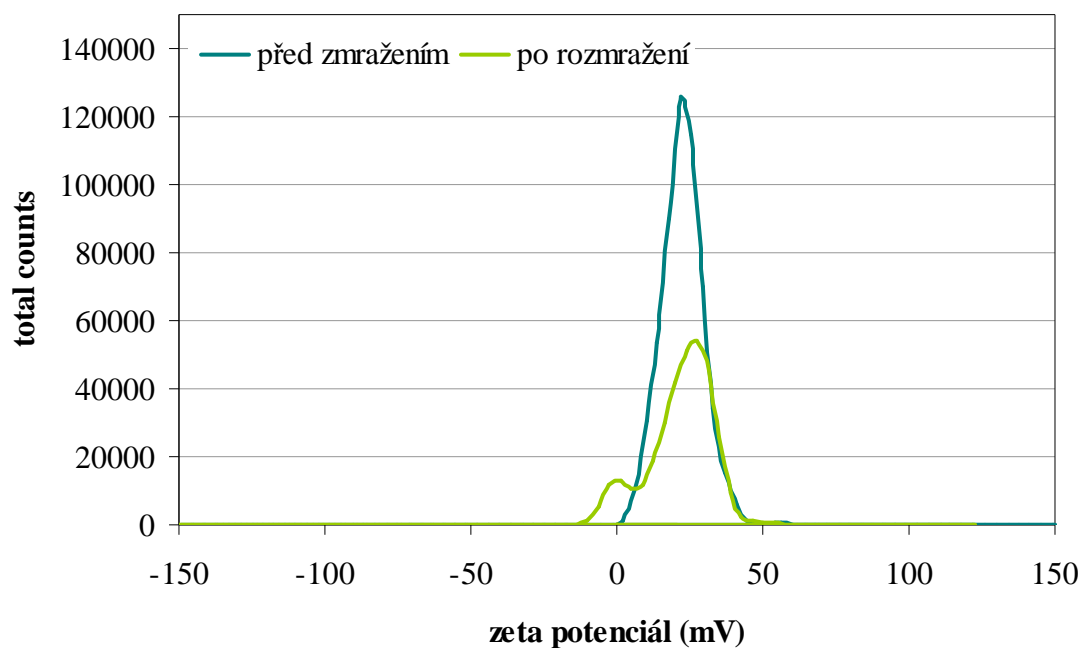
Hodnoty zeta-potenciálu vypovídají o kvalitě, resp. stabilitě systému. Obecně se jako hranice stabilního systému bere hodnota zeta-potenciálu vyšší než +30 mV nebo nižší než -30 mV. Při těchto hodnotách jsou částice v systému nabitý dostatečně velkými nábojem, který znemožňuje částicím vzájemné přibližování a následnou agregaci.

Porovnáním jednotlivých grafů, které znázorňují distribuce zeta-potenciálu pro různé teploty při směšování složek během přípravy, zjistíme, že zeta-potenciál agregátů přítomných v systému se pohybuje v hodnotách mezi 0–50 mV. Tyto hodnoty naznačují, že ne všechny částice v systému jsou zcela stabilní. Nejvyšší zastoupení však mají částice s hodnotou zeta-potenciálu mezi 20–30 mV. Na základě tohoto faktu lze předpokládat, že většina částic ve studovaném systému je téměř na hranici stability, pouze u části z nich může docházet k elektrostatickým interakcím mezi sebou navzájem.

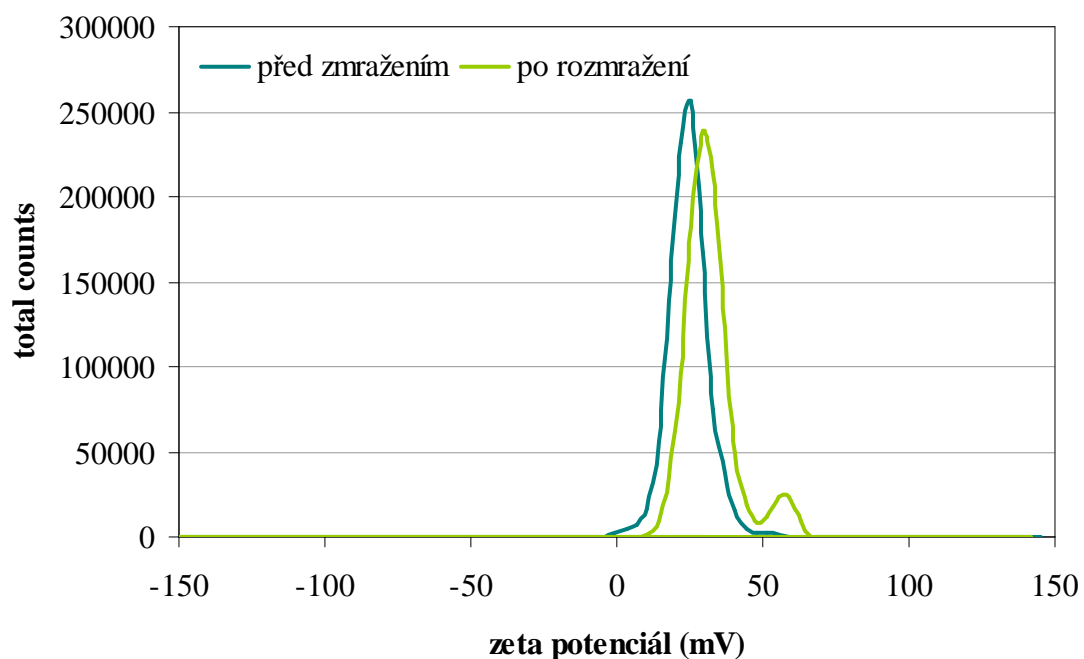
Křivky znázorňující stav systému po jeho rozmražení neukazují na téměř žádný významný vliv zmražení na následnou stabilitu systému. Lze si všimnout jen mírného posunu zeta-potenciálu k vyšším hodnotám, což by mohlo naznačovat, že zmražení systému má pozitivní vliv na následnou stabilitu.



Obr. 35: Distribuce zeta potenciálu systému nízkomolekulární hyaluronan-tenzid v prostředí vody pro směšovací teplotu 25 °C



Obr. 36: Distribuce zeta potenciálu systému nízkomolekulární hyaluronan-tenzid v prostředí vody pro směšovací teplotu 37 °C



Obr. 37: Distribuce zeta potenciálu systému nízkomolekulární hyaluronan-tenzid v prostředí vody pro směšovací teplotu 70 °C

Velikost zeta-potenciálu se pohybuje v kladných hodnotách, což značí, že agregáty vyskytující se v systému mají kladný náboj. Ve studovaném systému je obsažen kladně nabitý tenzid CTAB a záporně nabitý hyaluronan. Na základě faktu, že zeta-potenciál a tedy povrchový náboj částice je kladný, lze předpokládat, že koncentrace hyaluronanu není dostatečná na to, aby řetězce hyaluronanu zcela obklopily tenzidové micely a odstínily tak jejich náboj. Na druhé straně lze také uvažovat o tom, že koncentrace tenzidu je tak velká, že dochází k obalení řetězce či klubka hyaluronanu molekulami tenzidu, což má za následek kladný náboj výsledných agregátů. Koncentrace CTAB v systému činila $0,6 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Tato koncentrace nedosahuje CMC příslušného tenzidu v prostředí vody. Molekuly tenzidu jsou nejspíš navázány na řetězce hyaluronanu s tím, že se v roztoku začínají tvořit první micelární agregáty. Teoretický model těchto agregátů by mohl vypadat tak, že první micelární agregáty jsou částečně obaleny řetězci hyaluronanu. Toto uspořádání je výsledkem elektrostatických interakcí mezi záporně nabitými karboxylovými skupinami na hyaluronanu a kladně nabitými hlavami tenzidu. Tyto agregáty jsou pravděpodobně obaleny dalšími molekulami tenzidu kvůli jeho vysoké koncentraci.

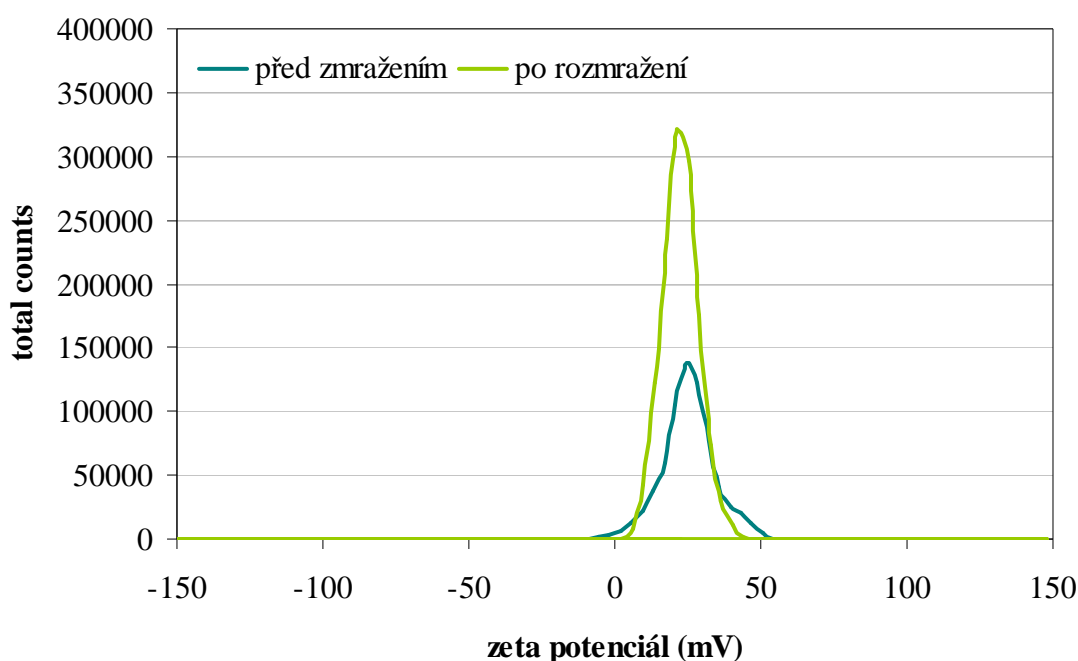
5.2.4 Režim ZETA, hyaluronan ($M_w = 1,46$ MDa) + CTAB v prostředí vody

Grafy na Obr. 38, Obr. 39 a Obr. 40 vyobrazují distribuce zeta-potenciálu těch systémů, které obsahovaly CTAB a hyaluronan o vysoké molekulové hmotnosti v prostředí vody. Jednotlivé grafy se opět liší v teplotách, při kterých bylo prováděno směšování složek při přípravě daného systému.

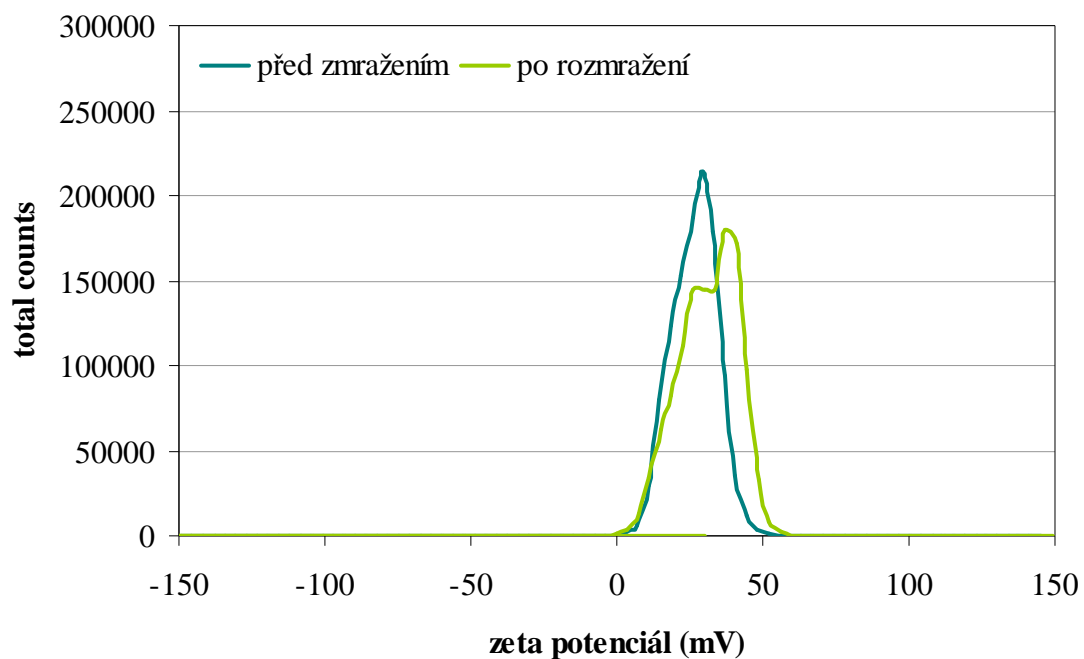
Uvedené distribuce znázorňují obdobné výsledky měření jako v případě systémů, které obsahovaly nízkomolekulární hyaluronan.

Hodnoty zeta-potenciálu se opět pohybují v rozmezí 0–50 mV, přičemž nejvyšší zastoupení mají částice s průměrnou hodnotou zeta-potenciálu průměrně 25 mV. Tato hodnota napovídá, že systémy s vysokomolekulárním hyaluronanem jsou mírně stabilnější než systémy obsahující nízkomolekulární hyaluronan.

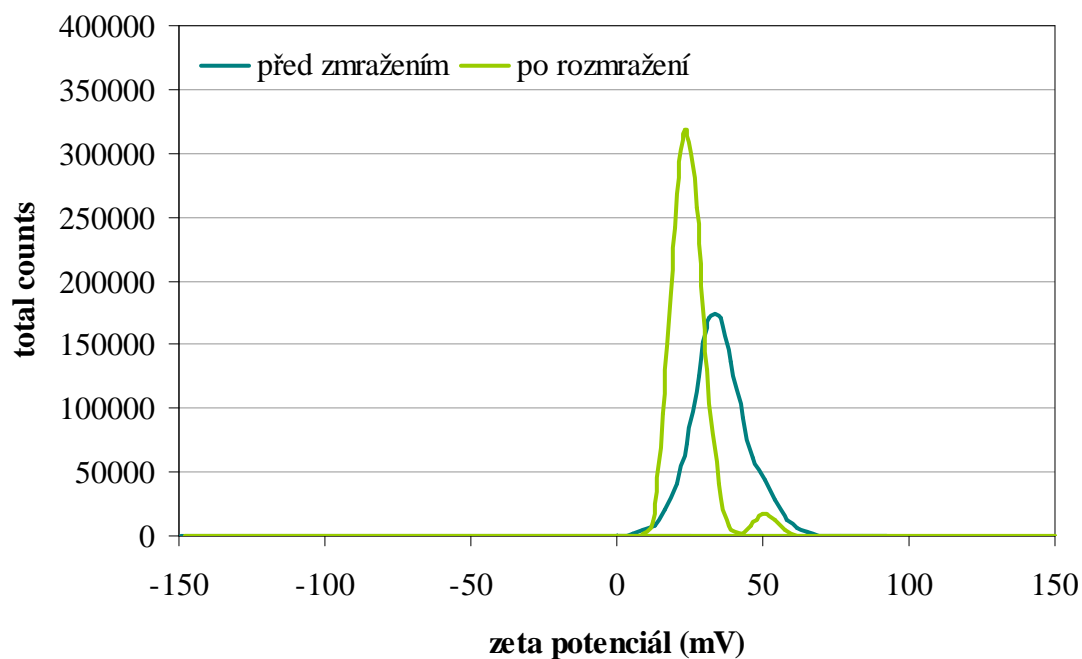
Zmražení těchto systémů opět nemělo téměř žádný vliv na následnou stabilitu agregátů v systému.



Obr. 38: Distribuce zeta potenciálu systému vysokomolekulární hyaluronan-tenzid v prostředí vody pro směšovací teplotu 25 °C



Obr. 39: Distribuce zeta potenciálu systému vysokomolekulární hyaluronan-tenzid v prostředí vody pro směšovací teplotu 37 °C



Obr. 40: Distribuce zeta potenciálu systému vysokomolekulární hyaluronan-tenzid v prostředí vody pro směšovací teplotu 70 °C

5.2.5 Systém hyaluronan + CTAB v prostředí soli

Systémy, jejichž prostředí tvořil roztok NaCl o koncentraci $0,15 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byly také proměřeny pomocí metody DLS. Měření těchto systémů bylo komplikovanější, jelikož byly dané systémy příliš polydisperzní. Prostředí soli tedy způsobuje odstínění elektrostatických repulzí mezi náboji na molekulách tenzidu a hyaluronanu. Následkem toho jsou tyto systémy velmi nestabilní, dynamické a polydisperzita systémů roste.

Dané systémy byly proměřeny pomocí režimu *size*. Nejprve musely být všechny vzorky přefiltrovány před membránový filtr s velikostí pórů $5 \mu\text{m}$, čímž se odstranil prach a případné agregáty, které znehodnocovaly výsledky intenzitní distribuce zastíněním rozptylu menších částic. Vzorky byly ponechány jeden den stát ve tmě při laboratorní teplotě. Stání vzorků způsobilo jejich ustálení, což se projevilo mírnou změnou distribucí, ale především vyladěním korelačních křivek.

Systémy byly následně přefiltrovány přes membránový filtr s velikostí pórů $0,2 \mu\text{m}$. Filtrace způsobila odstranění částic o velikostech okolo 6 nm . Dále filtrace způsobila, že výsledný systém obsahoval pouze částice o velikosti $100\text{--}600 \text{ nm}$. V systému byly tedy zastoupeny také částice, které svou velikostí převyšují velikost pórů ve filtru, což dokazuje, že agregáty vznikají elektrostatickými interakcemi. Filtrace způsobila „rozbití“ přítomných agregátů, které byly následně velmi rychle obnoveny.

Systémy byly dále zmrazeny a bylo opět provedeno jejich měření po filtraci přes membránový filtr s velikostí pórů $5 \mu\text{m}$ a $0,2 \mu\text{m}$. V případě filtru s póry $5 \mu\text{m}$ došlo ke zvýšení stability systému, což se projevilo na snížení polydisperzity systému a vyladění korelačních křivek. Při použití filtru s póry $0,2 \mu\text{m}$ nebyl vliv zmražení téměř patrný.

Daná koncentrace soli znemožňuje zjištění zeta-potenciálu pomocí použitého zařízení. Vodivost vzorku je příliš vysoká, což způsobuje zoxidování paladiových elektrod dip cely. Výsledky měření potvrzovaly, že je systém nestabilní a dochází v něm k agregacím. Náboj částic v systému není dost velký na to, aby znemožňoval částicím elektrostatické přitahování a následnou agregaci. Velikost zeta-potenciálu se pohybovala přibližně okolo 0 mV , což značí velkou nestabilitu systému.

6 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo stanovení vlivu podmínek přípravy systému biopolymer-tenzid na jeho solubilizační vlastnosti a na stabilitu vzniklých komplexů. Studovaným systémem se konkrétně stal komplex nativního hyaluronanu s kationtovým tenzidem CTAB. Prvotním úkolem práce bylo shromáždit literární poznatky o způsobech stanovení stability a solubilizačních vlastností v koloidních systémech a na základě zjištěných informací se seznámit s jednotlivými vhodnými technikami pro toto studium s přihlédnutím k využití fluorescenčních technik. Na základě provedené rešerše byla pro studium systému hyaluronan-CTAB vybrána metoda fluorescenční spektroskopie a metoda dynamického rozptylu světla. Obě tyto metody se ukázaly být vhodnými metodami pro studium solubilizačních a agregačních vlastností a pro studium stability daných systémů.

Vlastnosti daných systémů byly zkoumány při použití nízkomolekulárního a vysokomolekulárního hyaluronanu v prostředí vody nebo v prostředí roztoku NaCl o koncentraci $0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, který byl považován za fyziologický roztok. Pro techniku fluorescenční spektroskopie byl jako vhodná fluorescenční sonda vybrán pyren.

Byly navrženy experimenty porovnávající vliv teploty zásobních roztoků při přípravě systému na solubilizační vlastnosti vznikajících komplexů. Pro přípravu systémů byly tedy použity zásobní roztoky o laboratorní teplotě 25°C , roztoky zahřáté na 37°C , čímž byla modelována teplota lidského těla, a dále roztoky o vysoké teplotě 70°C . Zmrazení systémů bylo navrženo pro studium stability připravených systémů. V neposlední řadě byl také zkoumán vliv různých způsobů, jakými byla do systému zavedena fluorescenční sonda. V jednom případě byla sonda předsolubilizována v zásobním roztoku tenzidu, ve druhém případě byly nejprve smíchány zahřáté roztoky tenzidu a hyaluronanu a teprve poté byly dávkovány na fluorescenční sondu.

Metodou fluorescenční spektroskopie bylo zjištěno, že teplota zásobních roztoků při přípravě má vliv na velikost, počet či kompaktnost vznikajících agregátů, ovšem vliv teploty nemá jednoznačný trend. Při porovnávání úrovně polarizace blízkého okolí fluorescenční sondy před a po zmrazení systému bylo zjištěno, že zmrazení systému má ve většině případů za následek tvorbu kompaktnějších micel, jejichž stěna je méně propustná danému prostředí. Polaritní indexy ExPI získané z excitačních fluorescenčních spekter byly pro změnu polarizace okolí sondy citlivější než polaritní indexy EmPI získané z emisních fluorescenčních spekter a vykazovaly větší rozdíly v hodnotách.

Porovnáním tvorby excimeru v daných systémech bylo zjištěno, že metoda předsolubilizování sondy v zásobním roztoku není vhodným způsobem zavedení sondy do systému, jelikož jsou zásobní roztoky tenzidů obvykle několikrát koncentrovanější než výsledné systémy a sonda má tak mnoho prostoru pro svoji lokalizaci. Výsledná koncentrace sondy je tudíž menší než požadovaná. Důsledkem této metody je neznalost koncentrace sondy v systému bez dalších výpočtů. Na druhou stranu může být ovšem tento způsob zavedení hydrofobní látky do systému vhodný v případě solubilizace léčiva, jelikož je léčivo v micelách lokalizováno již od začátku a není narušováno dalšími manipulacemi, konkrétně například těmi teplotními. V případě dávkování zahřátých roztoků hyaluronanu a CTAB na sondu způsobil vliv zmrazení systému tvorbu většího počtu micel v systému, čímž klesla pravděpodobnost tvorby excimeru. Při předsolubilizování sondy v zásobním roztoku tenzidu je

koncentrace sondy v systému velmi nízká a pravděpodobnost tvorby excimeru v systému vlivem zmražení systému není tak patrná.

Metoda dynamického rozptylu světla poskytla náhled do velikostních distribucí studovaných systémů. U systémů, jejichž prostředí bylo tvořeno vodou, bylo zjištěno, že v případě nízkomolekulárního hyaluronanu docházelo se zvyšováním teploty při přípravě k tvorbě systémů s vyšší polydisperzitou, zatímco v případě systémů obsahujících vysokomolekulární hyaluronan byl tento trend opačný. Dále bylo zjištěno, že vlivem zmražení se následně v systému tvoří agregáty o větších velikostech, přičemž se také zvyšuje polydisperzita systému. Měření zeta-potenciálu neukázalo žádný významný vliv teploty, ani žádný významný vliv zmražení systému na jeho následnou stabilitu. Konkrétní hodnoty zeta-potenciálu naznačují, že systém hyaluronan-tenzid v prostředí vody je převážně stabilní. Systémy, jejichž prostředí bylo tvořeno roztokem soli, byly naopak velmi nestabilní a velmi polydisperzní. Pomocí filtrace těchto systémů byl potvrzen fakt, že systém hyaluronan-tenzid vzniká díky elektrostatickým interakcím, neboť i po filtraci byly v systému přítomny agregáty přesahující velikost pórů ve filtru.

Závěrem lze konstatovat, že zadané cíle byly splněny. Práce poskytla širší přehled o vlivu podmínek přípravy systému hyaluronan-tenzid na jeho solubilizační vlastnosti a stabilitu. Výsledky práce potvrzují fakt, že podmínky přípravy daného systému jsou důležité pro jeho výsledné vlastnosti, a že je důležité se tímto tématem dále zabývat.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] MALMSTEN, Martin. *Surfactants and polymers in drug delivery*. New York: Marcel Dekker, 2002, 348 s. ISBN 08-247-0804-0.
- [2] CHAVANPATIL, Mahesh D., Ayman KHAIR, Yogesh PATIL, Hitesh HANDA, Guangzhao MAO a Jayanth PANYAM. Polymer-surfactant nanoparticles for sustained release of water-soluble drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007, roč. 96, č. 12, s. 3379–3389. ISSN 00223549. DOI: 10.1002/jps.20961.
- [3] HASCALL, V. C. a T. C. LAURENT. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. In: *Glycoforum* [online]. 1997 [cit. 2012-02-21]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [4] SCOTT, J. E. . Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solutions. Some Biological Consequences. In: *Glycoforum* [online]. 1998 [cit. 2012-02-21]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.htm>
- [5] SVANOVSKÝ, E. Fyziologie a farmakologie kyseliny hyaluronové. *Česká a slovenská farmacie*. 2007, roč. 56, č. 6, s. 264–267. ISSN 1210-7816.
- [6] Účinek hyaluronanu při hojení ran. *Hydro* [online]. 1995 [cit. 2012-02-21]. Dostupné z: <http://www.hydro.cz/hyRubrIn.aspx?intRubrKis=1267&intLang=0>
- [7] Development of Biodegradable Scaffold for Dermo-Epidermal Skin Grafts. *Web.archive.org* [online]. 2005 [cit. 2012-02-04].. Dostupné z: http://www.biomateria.com/bio_skin_3.htm
- [8] SHU X.. Attachment and spreading of fibroblast on an RGD peptide-modified injectable hyaluronan hydrogel. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2004, č. 68, s. 365–375.
- [9] PUHL, W. a P. Scharf. Intra-articular hyaluronan treatment for osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 1997, č. 56, s. 637–640.
- [10] PHAM, T.. Evaluation of the symptomatic and structural efficacy of a new hyaluronic acid compound, NRD101, in comparison with diacerein and placebo in a 1 year randomised controlled study in symptomatic knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2004, č. 63, s. 1611–1617.
- [11] Gel Hylira. *Drugs.com* [online]. 2011 [cit. 2011-12-04].. Dostupné z: <http://www.drugs.com/cdi/hylira-gel.html>
- [12] SLÍVA, Jiří a Juraj MINÁRIK. Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí. *New EU Magazine of Medicine*. 2009, roč. 1, č. 2, s. 75–79.
- [13] WEEN, Miranda P., Martin K. OEHLER a Carmela RICCIARDELLI. Role of Versican, Hyaluronan and CD44 in Ovarian Cancer Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011, roč. 12, č. 2, s. 1009–1029. ISSN 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms12021009.
- [14] GÖTE, M. a G. W. YIP. Heparanase, Hyaluronan, and CD44 in Cancers: A Breast Carcinoma Perspective. *Cancer Research*. 2006-11-01, roč. 66, č. 21, s. 10233–10237. ISSN 0008-5472. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1464.
- [15] TOOLE, B. P. Hyaluronan-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities. *Clinical Cancer Research*. 2009-12-14, roč. 15, č. 24, s. 7462–7468. ISSN 1078-0432. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0479.

- [16] MISRA, Suniti, Paraskevi HELDIN, Vincent C. HASCALL, Nikos K. KARAMANOS, Spyros S. SKANDALIS, Roger R. MARKWALD a Shibnath GHATAK. Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *FEBS Journal*. 2011, roč. 278, č. 9, s. 1429–1443. ISSN 1742464X. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08071.x.
- [17] KOBAYASHI, Hiroyuki, Kentaro HORIKOSHI, Atsuyuki YAMATAKA, Tadaharu OKAZAKI a Takeshi MIYANO. Hyaluronic acid: A specific prognostic indicator of hepatic damage in biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery*. 1999, roč. 34, č. 12, s. 1791–1794. ISSN 00223468. DOI: 10.1016/S0022-3468(99)90314-7.
- [18] HRUBÝ, Martin, Jan KUČKA, Ján KOZEMPEL a Ondřej LEBEDA. Cílené polymerní nosiče léčiv v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy*. 2006, č. 100, s. 10–16.
- [19] DROBNÍK, Jaroslav. Hyaluronan in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1991, č. 7, s. 295–308.
- [20] LARSEN, Nancy E. a Endre A. BALAZS. Drug delivery systems using hyaluronan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1991, č. 7, s. 279–293.
- [21] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 4. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2005. ISBN 80-7080-475-0. Dostupné také z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-img/
- [22] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 2. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2001. ISBN 80-7080-422-X. Dostupné také z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-978-80-7080-674-6/pages-img/index.html
- [23] HUTTER, Tanya, Charles LINDER, Eliahu HELDMAN a Sarina GRINBERG. Interfacial and self-assembly properties of bolaamphiphilic compounds derived from a multifunctional oil. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2012, č. 365, s. 53–62.
- [24] Surfactant micelle characterization using dynamic light scattering. In: *Malvern.com* [online]. 2006 [cit. 2012-02-21]. Dostupné z: <http://quimica.udea.edu.co/~coloides/Anexo1.pdf>
- [25] KVÍTEK, Libor. *Metody studia koloidních soustav*. Katedra fyzikální chemie PřF UP Olomouc, 2006.
- [26] JACKSON, Kevin. Dynamický rozptyl světla – Co, jak a proč?. *CHEMagazín*. 2007, XVII, č. 1.
- [27] PABST, W. a E. GREGOROVÁ. *Charakterizace částic a částicových soustav*. VŠCHT Praha, 2007.
- [28] ŠENKEŘÍKOVÁ, Jana. *Charakterizace emulzí fotonovou korelační spektroskopií*. Zlín, 2010. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky. Vedoucí práce Ing. Věra Kašpárková, Csc.
- [29] MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Zetasizer Nano: Příručka pro uživatele*. Worcestershire, United Kingdom, 2007.
- [30] VALEUR, Bernard. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, 387 s. ISBN 35-272-9919-X.
- [31] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006, 954 s. ISBN 03-873-1278-1.

- [32] LLANOS, Panagiotis, Jacques LANG, Claude STRAZLELLE a Raoul ZANA. Fluorescence Probe Study of Oil-in-Water Microemulsions. 1. Effect of Pentanol and Dodecane or Toluene on Some Properties of Sodium Dodecyl Sulfate Micelles. *J. Phys. Chem.* 1982, č. 86, s. 1019–1025.
- [33] RAY, B., I. CHAKRABORTY a S. P. KOULIL. Pyrene absorption can be a convenient method for probing critical micellar concentration (cmc) and indexing micellar polarity. *Journal of Colloid and Interface Science.* 2006, č. 294, s. 248–254.
- [34] KALYANASUNDARAM, K. a J. K. THOMAS. Environmental Effects on Vibronic Band Intensities in Pyrene Monomer Fluorescence and Their Application in Studies of Micellar Systems. *Journal of the American Chemical Society.* 1977, č. 99, s. 2039–2044.
- [35] JONES, Marie-Christine a Jean-Christophe LEROUX. Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 1999, č. 48, s. 101–111.
- [36] BALDI, Leonardo D.C., Eduardo T. IMAZAKI a Teresa D.Z. ATVARIS. Evaluation of the polarity of polyamide surfaces using the fluorescence emission of pyrene. *Dyes and Pigments.* 2008, roč. 76, č. 3, s. 669–676. ISSN 01437208. DOI: 10.1016/j.dyepig.2007.01.011.
- [37] WINNIK, Mitchell A., Luke S. EGAN a Michal TENCER. Luminiscence studies on sterically stabilized polymer colloid particles: pyrene excimer formation. *Polymer.* 1987, č. 28, s. 1553–1561.
- [38] KRÁL, Vladimír, Jan ŠOTOLA, Petr NEUWIRTH, Zdeněk KEJÍK, Kamil ZÁRUBA a Pavel MARTÁSEK. Nanomedicína - současný stav a perspektivy: Velký potenciál, nebo jen módní slogan?. *Chemické listy.* 2006, č. 100, s. 4–9.
- [39] HALEY, Barbara a Eugene FRENKEL. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic Oncology: Seminar and Original Investigations.* 2008, č. 26, s. 57–64.
- [40] KWON, Glen S. a Teruo OKANO. Polymeric micelles as new drug carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 1996, č. 21, s. 107–116.
- [41] JIN, Yu-Jin, Termsarasab UBONVAN a Dae-Duk KIM. Hyaluronic Acid in Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Investigation.* 2010-05-15, roč. 40, spc, s. 33–43. ISSN 2093-5552. DOI: 10.4333/KPS.2010.40.S.033.
- [42] LARSEN, Nancy E. a Endre A. BALAZS. Drug delivery systems using hyaluronan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 1991, č. 7, s. 279–293.
- [43] DROBNÍK, Jaroslav. Hyaluronan in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 1991, č. 7, s. 295–308.
- [44] KÖTZ, J., S. KOSMELLA a T. BEITZ. Self-assembled polyelectrolyte systems. *Progress in Polymer Science.* 2001, č. 26, s. 1199–1232.
- [45] THALBERG, Kyrre a Björn LINDMAN. Interaction between Hyaluronan and Cationic Surfactant. *The Journal of physical chemistry.* Washington: American Chemical Society, 1989, č. 93, s. 1478–1483.

- [46] THALBERG, Kyrre, Björd LINDMAN a Gunnar KARLSTRÖM. Phase diagram of a System of Cationic Surfactant and Anionic Polyelectrolyte: Tetradecyltrimethylammonium Bromide-Hyaluronan-Water. *The Journal of physical chemistry*. Washington: American Chemical Society, 1990, č. 94, s. 4289–4295.
- [47] YIN, Dian-shu, Wan-yun YANG, Zhi-qiang GE a Ying-jin YUAN. A fluorescence study of sodium hyaluronate/surfactant interactions in aqueous media. *Carbohydrate Research*. 2005, roč. 340, č. 6, s. 1201–1206. ISSN 00086215. DOI: 10.1016/j.carres.2005.01.017.
- [48] XU, Jing, Huiyu BAI, Chenglin YI, Jing LUO, Cheng YANG, Wenshui XIA a Xiaoya LIU. Self-assembly behavior between native hyaluronan and styrylpyridinium in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*. 2011, roč. 86, č. 2, s. 678–683. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.05.006.
- [49] NIZRI, Gilat a Shlomo MAGDASSI. Solubilization of hydrophobic molecules in nanoparticles formed by polymerr surfactant interactions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2005, č. 291, s. 169–174. DOI: 10.1016/j.jcis.2005.04.109.
- [50] HALASOVÁ, T., J. KROUSKÁ, F. MRAVEC a M. PEKAŘ. Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2011, roč. 91, č. 1–3, s. 25–31. ISSN 09277757. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2011.05.035.
- [51] BEHERA, G.B., B.K. MISHRA, P.K. BEHERA a M. PANDA. Fluorescent probes for structural and distance effect studies in micelles, reversed micelles and microemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*. 1999, č. 2, s. 1–42.
- [52] CAMPBELL, Adrian a P. SOMASUNDARAN. Use of Pyrene Spectroscopic Probes in the Study of Colloidal Systems. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2000, roč. 229, č. 1, s. 257–260. ISSN 00219797. DOI: 10.1006/jcis.2000.7004.
- [53] RAY, Gargi Basu, Indranil CHAKRABORTY a Satya P. MOULIK. Pyrene absorption can be a convenient method for probing critical micellar concentration (cmc) and indexing micellar polarity. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2006, č. 294, s. 248–254. DOI: 10.1016/j.jcis.2005.07.006.
- [54] GLUSHKO, V., M. S. R. TAILER a KARP. Pyrene fluorescence fine structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1981, č. 210, s. 33–42. ISSN 0003-9861.
- [55] BALDI, Leonardo D. C., Eduardo T. IMAZAKI a Teresa D. Z. ATVARIS. Evaluation of the polarity of polyamide surfaces using the fluorescence emission of pyrene. *Dyes and Pigments*. 2008, roč. 76, č. 76, s. 669–676. ISSN 01437208.
- [56] WILHELM, Manfred. Poly(styrene-ethylene oxide) Block Copolymer Micelle Formation in Water: A Fluorescence Probe Study. *Macromolecules*. 1991, č. 24, s. 1033–1040.
- [57] ASTAFIEVA, I., X. Fu ZHONG a A. EISENBERG. Critical micellization Phenomena in block polyelectrolyte solutions. *Macromolecules*. 1993, č. 26, s. 7339–7352.
- [58] XU, Jing, Huiyu BAI, Chenglin YI, Jing LUO, Cheng YANG, Wenshui XIA a Xiaoya LIU. Self-assembly behavior between native hyaluronan and styrylpyridinium in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*. 2011, roč. 86, č. 2, s. 678–683. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.05.006.
- [59] MULLER, Francois L.L. Measurement of electrokinetic and size characteristics of estuarine colloids by dynamic light scattering spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*. 1996, č. 331, s. 1–15.

- [60] GARCÍA-GARCÍA, Sandra, Mats JONSSON a Susanna WOLD. Temperature effect on the stability of bentonite colloids in water. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2006, č. 298, s. 694–705.
- [61] BLINOVA, Natalia V., Irina SAPURINA, Josef KLIMOVÍ a Jaroslav STEJSKAL. The chemical and colloidal stability of polyaniline dispersions. *Polymer Degradation and Stability*. 2005, roč. 88, č. 3, s. 428–434. ISSN 01413910. DOI: 10.1016/j.polyimdegradstab.2004.11.014.
- [62] BRAR, Satinder K. a M. VERMA. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *Trends in Analytical Chemistry*. 2001, roč. 30, č. 1, s. 4–17. DOI: 10.1016/j.trac.2010.08.008.
- [63] RAO, J. Prasad a Kurt E. GECKELER. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*. 2011, roč. 36, č. 7, s. 887–913. ISSN 00796700. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001.
- [64] THEANDER, Katarina a Robert J. PUGH. The Influence of pH and Temperature on the Equilibrium and Dynamic. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2001, č. 239, s. 209–216.
- [65] MEHTA, S.K., et al. Effect of temperature on critical micelle concentration and. *Colloid and Surfaces A*. 2005, č. 255, s. 153–157.
- [66] ZIELINSKI, Ryszard. Effect of Temperature on Micelle Formation in Aqueous NaBr. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2001, č. 235, s. 201–209.
- [67] BAKSHI, Mandeep Singh; SACHAR, Shweta. Influence of temperature on the mixed micelles of Pluronic F127 and P103. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2005, č. 296, s. 309–315.
- [68] KRUTIŠOVÁ, Tereza. *Vliv způsobu přípravy systému biopolymer-tenzid na agregační vlastnosti systému*. Brno, 2010. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie.

8 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam zkratk

zkratka	význam
CMC	kritická micelární koncentrace
CTAB	cetyltrimetylamonium bromid
Da	Dalton, jednotka molekulové hmotnosti, 1 Da odpovídá $1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
DLS	dynamický rozptyl světla
EmPI	emisní polaritní index
ExPI	excitační polaritní index
HyA	kyselina hyaluronová, hyaluronan
NaCl	chlorid sodný
PAL	povrchově aktivní látka
PCS	fotonová korelační spektroskopie

8.2 Seznam symbolů

symbol	význam
λ	vlnová délka
λ_{em}	vlnová délka emisního záření
λ_{ex}	vlnová délka excitačního záření
c	koncentrace látky
D	difúzní koeficient
E	excimer
I_E	intenzita excimeru
I_M	intenzita monomeru
M	základní stav molekuly
M^*	excitovaný stav molekuly
M_w	molekulová hmotnost
Q	zhášec
S_0	základní stav molekuly
S_1	první excitovaný singletový stav molekuly
T_1	první excitovaný tripletový stav molekuly

9 PŘÍLOHY

9.1 Příloha 1

Tabulka č. 2: Hodnoty polaritních poměrů získaných z fluorescenčních skenů pro systémy ve stavu před zmražením; stejná teplota + různé systémy

teplota (°C)	složení vzorku	poměr EmPI ± odchylka*		poměr ExPI ± odchylka*		poměr I _E :I _M ± odchylka*	
		příprava A	příprava B	příprava A	příprava B	příprava A	příprava B
25	HyA 73 kDa + CTAB ve vodě	1,132 ± 0,006	1,18 ± 0,02	1,07 ± 0,03	1,01 ± 0,04	0,68 ± 0,03	0,073 ± 0,003
	HyA 1,46 MDa + CTAB ve vodě	1,14 ± 0,02	1,16 ± 0,01	1,04 ± 0,04	0,96 ± 0,03	0,67 ± 0,03	0,076 ± 0,002
	HyA 73 kDa + CTAB v soli	1,059 ± 0,006	1,07 ± 0,02	0,755 ± 0,006	0,86 ± 0,03	0,131 ± 0,004	0,030 ± 0,001
	HyA 1,46 MDa + CTAB v soli	1,049 ± 0,007	1,02 ± 0,03	0,76 ± 0,01	0,85 ± 0,01	0,132 ± 0,003	0,030 ± 0,002
37	HyA 73 kDa + CTAB ve vodě	1,143 ± 0,004	1,15 ± 0,01	1,10 ± 0,02	0,998 ± 0,003	0,668 ± 0,009	0,077 ± 0,007
	HyA 1,46 MDa + CTAB ve vodě	1,191 ± 0,007	1,265 ± 0,001	1,42 ± 0,04	1,05 ± 0,04	0,24 ± 0,02	0,073 ± 0,002
	HyA 73 kDa + CTAB v soli	1,048 ± 0,006	1,05 ± 0,03	0,781 ± 0,004	0,854 ± 0,006	0,13 ± 0,01	0,031 ± 0,002
	HyA 1,46 MDa + CTAB v soli	1,05 ± 0,01	1,073 ± 0,003	0,776 ± 0,003	0,86 ± 0,02	0,132 ± 0,003	0,033 ± 0,002
70	HyA 73 kDa + CTAB ve vodě	1,13 ± 0,01	1,13 ± 0,02	1,08 ± 0,05	0,99 ± 0,02	0,5 ± 0,1	0,073 ± 0,005
	HyA 1,46 MDa + CTAB ve vodě	1,14 ± 0,03	1,16 ± 0,03	1,1 ± 0,1	0,96 ± 0,02	0,54 ± 0,09	0,078 ± 0,003
	HyA 73 kDa + CTAB v soli	1,051 ± 0,003	1,05 ± 0,03	0,78 ± 0,02	0,85 ± 0,01	0,109 ± 0,002	0,031 ± 0,002
	HyA 1,46 MDa + CTAB v soli	1,048 ± 0,002	1,063 ± 0,003	0,789 ± 0,003	0,863 ± 0,004	0,108 ± 0,002	0,032 ± 0,001

* směrodatná odchylka

příprava A = zahřáté roztoky dávkovány do vialek s pyrenem

příprava B = pyren předsolubilizován v zásobním roztoku CTAB

Tabulka č. 3: Hodnoty polaritních poměrů získaných z fluorescenčních skenů pro systémy ve stavu po rozmražení; stejná teplota + různé systémy

teplota (°C)	složení vzorku	poměr EmPI ± odchylka*		poměr ExPI ± odchylka*		poměr I _E :I _M ± odchylka*	
		příprava A	příprava B	příprava A	příprava B	příprava A	příprava B
25	HyA 73 kDa + CTAB ve vodě	1,18 ± 0,02	1,09 ± 0,03	1,022 ± 0,007	0,854 ± 0,007	0,49 ± 0,02	0,075 ± 0,002
	HyA 1,46 MDa + CTAB ve vodě	0,16 ± 0,01	1,05 ± 0,02	1,07 ± 0,05	0,86 ± 0,04	0,48 ± 0,02	0,075 ± 0,001
	HyA 73 kDa + CTAB v soli	1,07 ± 0,02	1,054 ± 0,009	0,693 ± 0,002	0,75 ± 0,01	0,119 ± 0,001	0,038 ± 0,001
	HyA 1,46 MDa + CTAB v soli	1,02 ± 0,03	1,073 ± 0,006	0,689 ± 0,006	0,703 ± 0,007	0,125 ± 0,004	0,033 ± 0,000
37	HyA 73 kDa + CTAB ve vodě	1,15 ± 0,01	1,08 ± 0,03	0,99 ± 0,02	0,870 ± 0,007	0,53 ± 0,01	0,078 ± 0,008
	HyA 1,46 MDa + CTAB ve vodě	1,265 ± 0,001	1,10 ± 0,02	1,467 ± 0,001	0,91 ± 0,03	0,174 ± 0,006	0,09 ± 0,01
	HyA 73 kDa + CTAB v soli	1,05 ± 0,03	1,03 ± 0,03	0,703 ± 0,001	0,74 ± 0,03	0,125 ± 0,006	0,035 ± 0,004
	HyA 1,46 MDa + CTAB v soli	1,073 ± 0,003	1,05 ± 0,02	0,699 ± 0,003	0,75 ± 0,03	0,123 ± 0,001	0,032 ± 0,003
70	HyA 73 kDa + CTAB ve vodě	1,13 ± 0,02	1,05 ± 0,04	1,03 ± 0,06	0,85 ± 0,02	0,43 ± 0,10	0,081 ± 0,005
	HyA 1,46 MDa + CTAB ve vodě	1,06 ± 0,03	1,01 ± 0,02	1,1 ± 0,2	0,87 ± 0,03	0,40 ± 0,07	0,083 ± 0,005
	HyA 73 kDa + CTAB v soli	1,05 ± 0,03	1,041 ± 0,003	0,711 ± 0,004	0,730 ± 0,009	0,107 ± 0,004	0,033 ± 0,002
	HyA 1,46 MDa + CTAB v soli	1,063 ± 0,003	1,065 ± 0,003	0,73 ± 0,02	0,75 ± 0,04	0,101 ± 0,005	0,034 ± 0,000

* směrodatná odchylka

příprava A = zahřáté roztoky dávkovány do vialek s pyrenem

příprava B = pyren předsolubilizován v zásobním roztoku CTAB

Tabulka č. 4: Hodnoty polaritních poměrů získaných z fluorescenčních skenů pro systémy ve stavu před zmražením; různá teplota + stejné systémy

teplota (°C)	složení vzorku	poměr EmPI ± odchylka*		poměr ExPI ± odchylka*		poměr I _E :I _M ± odchylka*	
		příprava A	příprava B	příprava A	příprava B	příprava A	příprava B
25	HyA 73 kDa + CTAB ve vodě	1,132 ± 0,006	1,18 ± 0,02	1,07 ± 0,03	1,01 ± 0,04	0,68 ± 0,03	0,073 ± 0,003
37		1,143 ± 0,004	1,15 ± 0,01	1,10 ± 0,02	0,998 ± 0,003	0,668 ± 0,009	0,077 ± 0,007
70		1,13 ± 0,01	1,13 ± 0,02	1,08 ± 0,05	0,988 ± 0,02	0,5 ± 0,1	0,073 ± 0,005
25	HyA 1,46 MDa + CTAB ve vodě	1,14 ± 0,02	1,16 ± 0,01	1,04 ± 0,04	0,96 ± 0,03	0,67 ± 0,03	0,076 ± 0,002
37		1,191 ± 0,007	1,265 ± 0,001	1,42 ± 0,04	1,05 ± 0,04	0,24 ± 0,02	0,073 ± 0,002
70		1,14 ± 0,03	1,16 ± 0,03	1,1 ± 0,1	0,96 ± 0,02	0,54 ± 0,09	0,078 ± 0,003
25	HyA 73 kDa + CTAB vsoli	1,059 ± 0,006	1,07 ± 0,02	0,755 ± 0,006	0,86 ± 0,03	0,131 ± 0,004	0,030 ± 0,001
37		1,048 ± 0,006	1,05 ± 0,03	0,781 ± 0,004	0,854 ± 0,006	0,13 ± 0,01	0,031 ± 0,002
70		1,051 ± 0,003	1,05 ± 0,03	0,78 ± 0,02	0,85 ± 0,01	0,109 ± 0,002	0,031 ± 0,002
25	HyA 1,46 MDa + CTAB v soli	1,049 ± 0,007	1,02 ± 0,03	0,76 ± 0,01	0,85 ± 0,01	0,132 ± 0,003	0,030 ± 0,002
37		1,05 ± 0,01	1,073 ± 0,003	0,776 ± 0,003	0,86 ± 0,02	0,132 ± 0,003	0,033 ± 0,002
70		1,048 ± 0,002	1,063 ± 0,003	0,789 ± 0,003	0,863 ± 0,004	0,108 ± 0,002	0,032 ± 0,001

* směrodatná odchylka

příprava A = zahřáté roztoky dávkovány do vialek s pyrenem

příprava B = pyren předsolubilizován v zásobním roztoku CTAB

Tabulka č. 5: Hodnoty polaritních poměrů získaných z fluorescenčních skenů pro systémy ve po rozmražení; stejná teplota + různé systémy

teplota (°C)	složení vzorku	poměr EmPI ± odchylka*		poměr ExPI ± odchylka*		poměr I _E :I _M ± odchylka*	
		příprava A	příprava B	příprava A	příprava B	příprava A	příprava B
25	HyA 73 kDa + CTAB ve vodě	1,18 ± 0,02	1,09 ± 0,03	1,022 ± 0,007	0,854 ± 0,007	0,49 ± 0,02	0,075 ± 0,002
37		1,15 ± 0,01	1,08 ± 0,03	0,99 ± 0,02	0,870 ± 0,007	0,53 ± 0,01	0,078 ± 0,008
70		1,13 ± 0,02	1,05 ± 0,04	1,03 ± 0,06	0,85 ± 0,02	0,43 ± 0,09	0,081 ± 0,005
25	HyA 1,46 MDa + CTAB ve vodě	0,16 ± 0,01	1,05 ± 0,02	1,07 ± 0,05	0,86 ± 0,04	0,48 ± 0,02	0,075 ± 0,001
37		1,265 ± 0,001	1,10 ± 0,02	1,467 ± 0,001	0,91 ± 0,03	0,174 ± 0,006	0,09 ± 0,01
70		1,06 ± 0,03	1,01 ± 0,02	1,1 ± 0,2	0,87 ± 0,03	0,40 ± 0,07	0,083 ± 0,005
25	HyA 73 kDa + CTAB v soli	1,07 ± 0,02	1,054 ± 0,009	0,693 ± 0,002	0,75 ± 0,01	0,119 ± 0,001	0,038 ± 0,001
37		1,05 ± 0,03	1,03 ± 0,03	0,703 ± 0,001	0,74 ± 0,03	0,125 ± 0,006	0,035 ± 0,004
70		1,05 ± 0,03	1,041 ± 0,003	0,711 ± 0,004	0,73 ± 0,01	0,107 ± 0,004	0,033 ± 0,002
25	HyA 1,46 MDa + CTAB v soli	1,02 ± 0,03	1,073 ± 0,006	0,689 ± 0,006	0,703 ± 0,007	0,125 ± 0,004	0,033 ± 0,000
37		1,073 ± 0,003	1,05 ± 0,02	0,699 ± 0,003	0,75 ± 0,03	0,123 ± 0,001	0,032 ± 0,003
70		1,063 ± 0,003	1,065 ± 0,003	0,73 ± 0,02	0,75 ± 0,04	0,101 ± 0,005	0,034 ± 0,000

* směrodatná odchylka

příprava A = zahřáté roztoky dávkovány do vialek s pyrenem

příprava B = pyren předsolubilizován v zásobním roztoku CTAB